



T.C
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BURSA NİLÜFER ÇAYI SUYUNUN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN
BALIK MİKRONUKLEUS TESTİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

ŞENAY SUMMAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA, 2009

1.GİRİŞ

Su kaynaklarının kirliliği önemli ve hızla artan bir problemdir. Konu ile ilgili yasalara rağmen toksik kimyasal kirleticiler, yerel ve endüstriyel sıvı atıklar sucul çevrelerdeki kontaminasyonun ana kaynaklarıdır (Claxton ve Hugles 1998, White ve Rasmussen 1998). Sucul çevredeki mutajenik kimyasallar yerleşim bölgelerindeki kanalizasyonlardan, endüstriyel ve yerel atıkların nehirlere, denize ve göllere boşaltılmasından kaynaklanmaktadır (Ergene ve ark., 2007). Bu maddelerin sürekli salınımı, kirli sucul çevrelere bağlı genotoksisite ile ilgili çalışmalara olan ilgiyi arttırmıştır (Chen ve White 2004).

Mutajenik/karsinojenik etki gösteren pek çok kimyasal nehirlerde, deniz kıyılarında, göllerde, sedimentlerde, havada ve içme sularında bulunmaktadır (Deguchi ve ark. 2006). Sucul çevrede ağır metallerin varlığı, pek çok yaşam formuna toksik ve genotoksik etkileri nedeniyle ilgilenilen konulardan biridir (Valko ve ark. 2005). Pek çok endüstriyel süreç, krom (Cr), kadmiyum (Cd), bakır (Cu), kurşun (Pb), nikel (Ni), çinko (Zn), magnezyum (Mg), demir (Fe) ve arsenik (As) gibi ağır metaller ve iz metalleri içeren sıvı atıklar üretirler (Ali ve ark., 1996). Ayrıca ağır metaller tarımsal alanlarda ve şehirlerdeki su kaynaklarında kirliliğe yol açabilirler. Evsel sıvı atıklar (Cd, Cu, Cr, Pb ve Zn), mineral kimyasal gübreler (Cd, Cr, Mo, Pb ve Zn) ve pestisitler (Cu, As, Pb, Mn ve Zn) çevrede önemli kirliliğe yol açabilirler (Alloway 1995; Aonghusa ve Gray 2002).

Balıklar gibi sucul organizmalar, kontamine olmuş sulardaki kirleticileri ya doğrudan alırlar, ya da kirleticilere maruz kalmış sucul organizmaları besin olarak alarak dolaylı olarak biriktirirler. Böylece genotoksik kirleticiler sadece sucul organizmalar için değil, tüm ekosistem ve sonuçta besin zinciri ile insanlarda da birikime yol açabilir (Matsumoto ve ark. 2006). Kirleticiler sucul organizmalar tarafından vücuda alınmakta ve yağ dokularında birikmektedir. Pek çok ülkede balıklar ve kabuklu deniz hayvanları (özellikle Japonya'da) protein kaynağı olarak önemlidirler.

Bu kirlenmiş sucul ürünlerin besin olarak alınması insanlarda da yan etkilere yol açabilir. Gerçekten de su kaynaklarına yakın bölgelerde yaşayan insanlarda düşük doğum ağırlığı gibi olumsuz sağlık etkileri; doğumlarda bebek anomalilerinde ve bazı kanser tiplerinde artış gözlenmiştir (Deguchi ve ark. 2006).

Balıklarda ağır metallerin çarpıcı birikim miktarı diğer tüm iz elementleri geçmektedir (Zhu ve ark. 2004). Balıklarda ağır metallerin yüksek konsantrasyonları normal metabolizmaya karışmakta ve balıkçıların av kaynaklarını azaltmaktadır (De Conto ve ark. 1998). Bu nedenle son zamanlarda ağır metallerin toksik mekanizmalarını belirlemek üzere çok sayıda çalışma yapılmaktadır ve ağır metallerin birikme, salınım ve balık organlarında dağılım sürecine etki eden faktörler araştırılmaktadır (McGeer ve ark. 2000, Smet ve ark. 2001). Çalışmaların çoğu, yine de, tek bir ağır metale odaklanmaktadır. Birkaç ağır metal çeşidinin birlikte neden oldukları etkileşimli toksik etkilerine ait nispeten daha az bilgiye ulaşılabilmektedir (Zhu ve ark. 2004).

Doğal yaşam alanlarında, canlıların genetik materyaline, hem kimyasal hem de fiziksel ajanlar zarar verebilirler. DNA molekülünün yapısındaki ya da fonksiyonundaki bir değişiklik, eğer onarım mekanizmaları tarafından giderilmezse, biyolojik organizasyonun farklı seviyelerinde farklı etkilerin ortaya çıkmasına yol açabilir (Llorente ve ark. 2001). DNA ve kromozom hasarları karsinojenik ve/veya genotoksik ajanlara maruz kalmayı takiben en kritik olaylardır. Yetersiz veya yanlış DNA onarılması sonucu oluşan kromozomal hasar, hücre bölünmesi sırasında kalıcı hale gelir ve ajanların genotoksik etkileri için bir indeksi temsil eder. Genotoksik ajanlara maruz kalan hücrelerde kromozomal etkiler makrolezyonlar olarak ölçülebilir (Bolognesi ve ark. 2006).

Genellikle *in vitro*' da bakteri, maya, memeli hücre kültürleri ve *in vivo*' da kemirgenler, kimyasalların genotoksisite çalışmalarında kullanılır. Balık ve diğer sucul organizmalar yetiştirilmelerinin zor olması veya düşük omurgalılarda gözlenen küçük ve/veya yüksek sayıda kromozoma sahip olmaları nedeniyle sıkça kullanılmamaktadırlar (Ojima ve ark. 1976). Mikronukleus testi çoğalan hücre populasyonlarında, özellikle kemirgen kemik iliği hücrelerinde kromozom hasarlarını *in*

vivo olarak belirlemek için kullanılan sitogenetik bir metottur. Bu yöntemin avantajlarından biri, çoğalmakta olan herhangi bir hücre topluluğuna karyotipine bağlı olmaksızın uygulanabilir olmasıdır. Balık kromozomları küçüktür, metafazda kromozom aberasyonlarının tespiti zordur. Diğer yandan, mikronukleus çekirdeğin yanında ya da memelilerde çekirdeksiz eritrositlerde küçük bir çekirdekçik olarak kolayca belirlenebilir. Bu nedenle kromozom küçüklüğü ve yüksek kromozom sayısı mikronukleus testinin işlevini etkilemez, yani balıklarda ya da diğer sucul canlılarda kolaylıkla uygulanabilir (Hayashi ve ark. 1997).

Mikronukleus (MN), mitoz esnasında kromozomal fragmentlerin veya kromozomun tamamının yavru çekirdeğe dahil olmasından kaynaklanır. MN çekirdekten ayrılmış kromatinlerin küçük fragmentleridir, kromozom kırıkları veya iç ipliği bozukluklarının göstergesidirler (Schmid 1975). Bu test karyotipe bakmaksızın çoğalan herhangi bir hücre popülasyonuna interfazda uygulanabilme avantajına sahiptir. MN periferik eritrositler, solungaç, böbrek, karaciğer ve yüzgeç hücreleri gibi farklı balık hücre tiplerinde analiz edilebilir (Al-Sabti ve Metcalfe 1995, Arkhiphuck ve Garanko 2005). Solungaç epiteli, tüm su kaynaklı kirleticiler için birincil hedefdir. Çevresel kirleticilerin sitogenetik etkilerine karşı yüksek hassasiyet gösterirler ve yüksek MN seviyesine ulaşabilirler. Ancak MN analizi için solungaç hücreleri kolay elde edilip hazırlanamamaktadır. Karaciğer hücrelerinin düşük mitotik indeksleri nedeniyle balık hepatositlerinde MN analizinin bazı sınırlamaları vardır. Balıklarda periferik eritrositlerin kullanımı, hücre hazırlanması ve hayvanların feda edilmesi ile bağlantılı karmaşık prosedürler gerektirdiği halde MN testi daha avantajlıdır. Hematopoetik dokuların yüksek mitotik hızlarının sonucu olarak genotoksik uygulamalara hızlı yanıt veren periferik kan hücrelerinde, kromozomal hasarın bir göstergesi olan mikronukleuslar sayılıp değerlendirilebilir (Bolognesi ve ark. 2006).

Son yıllarda geniş bir kirletici ağıyla su ekosistemlerinin kontaminasyonu, sadece içme suyu kaynaklarını tehdit etmekle kalmayıp aynı zamanda sucul yaşama da zarar vermektedir (Akif ve ark. 2002). Bursa sınırları içerisinde doğup Marmara Denizine dökülen Nilüfer Çayı da Bursa'daki hızlı, sanayileşmeyle oluşan evsel ve endüstriyel atık suların direkt deşarjından kaynaklanan kirlilikten ciddi derecede etkilenmektedir.

Bu çalışmada evsel ve sanayi kaynaklı değişik kirleticilerle etkilenen, Nilüfer çayının bazı istasyonlarında fizikokimyasal parametreleri ve bu kirleticilerin olası genotoksik etkilerini İsrail sazanı *Oreochromis niloticus*'ta mikronukleus testiyle belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Toksik maddeler, endüstriyel kimyasallar, pestisitler ve radyoaktif maddeler içeren tehlikeli atıklar çoğalan miktarlarla çevreye salınmaktadır. Hava, su ve toprak kirliliği ile çevre kalitesi ve insan sağlığı zarar görecektir şekilde etkilenmektedir (Karaer 1996).

İnsan kaynaklı kimyasal kirlilik kaynakları genellikle endüstriyel, tarımsal ve kentsel aktivitelere bağlıdır. Pek çok kirletici kaynak karmaşık toksik karışımlar olarak su, toprak ve kayalara girerler (Ferreira ve ark. 2008).

Son yıllarda, çevremizde bulunan çeşitli kirleticilere ve bunların insan sağlığına olası etkilerine karşı artan bir ilgi oluşmuştur. Tüm dünyada, hava kirliliği insan sağlığına ve ekosisteme artan oranda tehlike yaratmaktadır. Hava kirleticilerinin konsantrasyonlarının ölçülmesinin önemi, kirliliği, azaltmak için yapılan programların ayrılmaz bir parçası olup, hem resmi hem de özel kurumlar tarafından araştırılmaktadır (Tuncel ve ark. 1996). Endüstriyel faaliyetlerde enerji üretiminde, ısınmada ve taşımada, fosil yakıtların yanması genotoksik bileşik kaynakları olarak bilinmektedir. Bunların dışında havaya doğrudan salınan genotoksik bileşiklerin, fotokimyasal veya kimyasal bozunmaları sonucu çevrede farklı genotoksik bileşiklere dönüştüğü düşünülmektedir. Bu atmosferik bileşikler sonuçta yere çökerler ve böylece yeryüzü bu genotoksik bileşikler tarafından kirletilmiş olur (Watanabe ve Hirayama 2001).

Endüstriyel artıklar ve bunların sıvı atıkları toprağı da kirletir. Tarımsal alanlarda genotoksik bileşikler içeren gübreler, pestisitler ve herbisitler gibi kimyasallar çokça kullanılmaktadır. Ayrıca toprak mikroflorası da genotoksik olmayan bazı bileşikleri genotoksik bileşiklere dönüştürebilir. Topraktaki genotoksik bileşikler tozlar aracılığıyla solunumla alınabilir. Topraktan bu bileşikler alan bitkiler besin olarak kullanılabilir. Bu bileşikler topraktan yer altı ve yer üstü su kaynaklarına geçerek içme

suyu olarak kullanılabilir ve bunları kullanan topluluklarda insan sağlığı için de bir tehdit oluşturabilirler (Watanabe ve Hirayama 2001).

Tüm dünyada kirli bölgelerdeki deniz sedimentlerinde, 1000'den fazla karsinojenik bileşik belirlenmiştir ve bu kimyasalların çoğu sucul bölgelerde yaşayan organizmaların büyük bölümünde biriktirilmektedir. Kıyı bölgeleri, kıyı bölgelerindeki endüstriyel yerleşimler ve denizcilik faaliyetleri nedeniyle artan bir toksik kirlenme riski altındadır. Bilinen pek çok genel su kirleticileri sadece akut etkileri için çalışılmışlardır ve uzun süreli çevresel etkileri bilinmemektedir. Suların sadece fiziksel ve kimyasal özelliklerinin incelenmesinin, sucul ekosistemin sağlığının değerlendirilmesi konusunda yeterli olmadığı düşünölmektedir. Deniz organizmalarında bu bileşiklerin toksik ve genotoksik etkilerini araştırmak gereklidir. Pek çok ölkede su kirliliği nedeniyle genotoksisite testleri yapılmaktadır. (Bolognesi ve ark. 1996, Bolognesi ve ark. 2006, Oberholster ve ark. 2007).

2.1. Genetik Toksikoloji

Son yıllarda, kansere yol açan süreçlerin anlaşılması yolunda büyük ilerleme kaydedilmiştir. Genetik materyaldeki değişikliklerin bu süreçlere dâhil olduğu ve uygun koşullar altında pek çok karsinojenin bu tip değişimlere yol açtığı ortadadır (IPCS 1985).

Farmasötik ürünler, evlerde ve besinlerde kullanılan kimyasallar, pestisitler ve petrol ürünlerini de kapsayan binlerce kimyasal çevremizde bulunmaktadır ve her yıl bu kimyasallara yenileri eklenmektedir. Bunlara ek olarak, mutajenik/karsinojenik olduğu bilinen (örn: besinlerde bulunan mikotoksinler) doğal olarak meydana gelen pek çok bileşik vardır. Gerek bilinçli (örn: terapötik olarak), gerek günlük yaşamlarında (örn: evsel ürünler, kozmetikler v.s.) veya dikkatsizlik sonucu (örn: pestisitler) insanların maruz kaldıkları kimyasallar, kansere ya da genetik hasara (mutasyon) neden olma olasılıkları nedeniyle önemlidirler (IPCS 1985).

DNA ile etkileşime giren kimyasallar, DNA'nın yapısında değişikliklere neden olurlar. Bazların kaybı, eklenmesi veya yer değişimi ve böylece DNA dizilerinin değişmesi genetik şifreyi değiştirir. (IPCS 1985).

Literatürlerde genotoksisite araştırmaları için bakteriyofajlardan memelilere kadar birçok organizmanın kullanıldığı 100'den fazla test sistemi olmasına rağmen, bu test sistemlerinin 20'sinden azı düzenli olarak kullanılmakta ve bunlardan bazıları sadece özel laboratuarlarda yapılabilmektedir. Bu test sistemlerinden genellikle kullanılanlar arasında *in vitro* sitogenetik sistemler kromozom hasarlarının sonuçlarını göstermek üzere dizayn edilmiş olup; kültürü yapılan hücrelerde kromozom hasarları ışık mikroskobu altında belirlenebilmektedir. Bu uygulama genellikle hücre siklusunun metafaz safhasında belirlemeyi gerektirmektedir (Freshney, 2001).

Modern genetikte esas olarak alınan kavramların çoğu yüksek bitkilerde belirlenmiş ve mutasyon terimini ilk kez Hollandalı botanikçi Hugo de Vries tarafından 1909'da *Oenothera lamarckiana* daki ani kalıtsal değişimler için kullanılmıştır. Bitki sistemleri eski çalışmalarda radyasyon kaynaklı genetik değişiklikler için önemli rol oynamışlardır. Pek çok bitki türü, kimyasalların gen ve kromozom seviyesinde mutajenik etkilerini inceleyen çalışmalarda kullanılmıştır. Bakteriler, alçak bitkiler, böcekler ve memeli hücrelerinde mutasyon belirlemeye dayanan genotoksisite tekniklerinin artan kullanımı, yüksek bitkilerde mutajenik etkileri olduğu düşünülen kimyasallar ile yapılan çalışmaların azalmasına sebep olmuştur (IPCS, 1985).

İnsan hücrelerini de kapsayan, memeli hücre kültürlerinin kullanımı, mutasyon çalışmaları için memeli genomunda mutajenlere karşı meydana gelen cevabı anlamak için hızlı bir analiz yöntemidir (IPCS 1985, Freshney 2001).

Sıçan, fare ve hamsterların kemik iliği hücrelerinin metafaz kromozom analizi *in vivo* kromozom hasarı tespit çalışmaları için ideal bir yöntemdir. Bu yöntem alternatif olarak belirli kemik iliği hücrelerinde ve diğer dokularda kromozom ve kromozom fragmentlerinin oluşturduğu mikronukleuslar belirlenebilir. Mikronukleus testinin kromozom hasarına yol açabilen kimyasalları belirlemede kolay bir yöntem olduğu

kanıtlanmıştır (IPCS,1985). Şekil 2.1’de mikronukleusların oluşum mekanizmaları ayrıntılı olarak gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Mikronukleus oluşum mekanizmaları

Sirke sineği *Drosophila melanogaster* de in vivo somatik mutasyonların ve kimyasala maruz bırakılmış germ hücre topluluklarında kromozom aberasyonlarının belirlenmesinde kullanılabilen bir diğer test organizmasıdır (IPCS,1985).

Kromozom aberasyonu ile ilgili genel görüşlere göre aynı biyolojik sistemlerde belirli toksik maddelerin aynı etkiyi gösterdiği (örneğin aynı moleküler hedef) ve belirli toksik bileşiklere aynı oranlarda cevap oluşturduğu varsayılmaktadır (Ferreira ve ark. 2008).

Modern endüstrileşmenin meydana getirdiği çevre kirliliği nedeniyle karsinojenik etki gösteren maddelerin çevresel miktarı artmıştır. Bu maddeler çevresel karsinojenler olarak bilinir ve pek çok organdaki kanser türlerinin ve tüm kanser vakalarının %75'nin sebebi oldukları düşünülmektedir (Karaer 1996). Çizelge 2.1'de çeşitli çevresel kirleticiler ve insanların bunlara maruz kalma durumları verilmiştir.

Çizelge 2.1. Çevresel Kirleticiler ve İnsanların Maruz Kaldığı Yollar*

Sınıf ya da örnek	İnsanların maruz kaldığı durumlar
Polisiklik aromatik hidrokarbonlar	İlaç
Nitrozaminler	Kauçuk katkı maddeleri, görünüşte besin maddelerinde bulunan nitritlerin metabolizma olmasıyla oluşur.
Metalik tozlar Kadmiyum Arsenik	Elektronik endüstrisi, plastiklerin stabilize edilmesi, v.s Pestisitler,farmasotik endüstri

*Kaynak: Ramada, 1987.

2.2. Genotoksisite Testlerinde Model Organizma Olarak Balıklar

Mutajenite testlerinde kullanılacak organizmalar seçilirken organizmanın, potansiyel mutajenin oluşturacağı genetik materyaldeki yapısal ve/veya sayısal kromozom aberasyonları gibi modifikasyonları belirlemeye uygun olması gerekmektedir (Matsumoto ve ark. 2006).

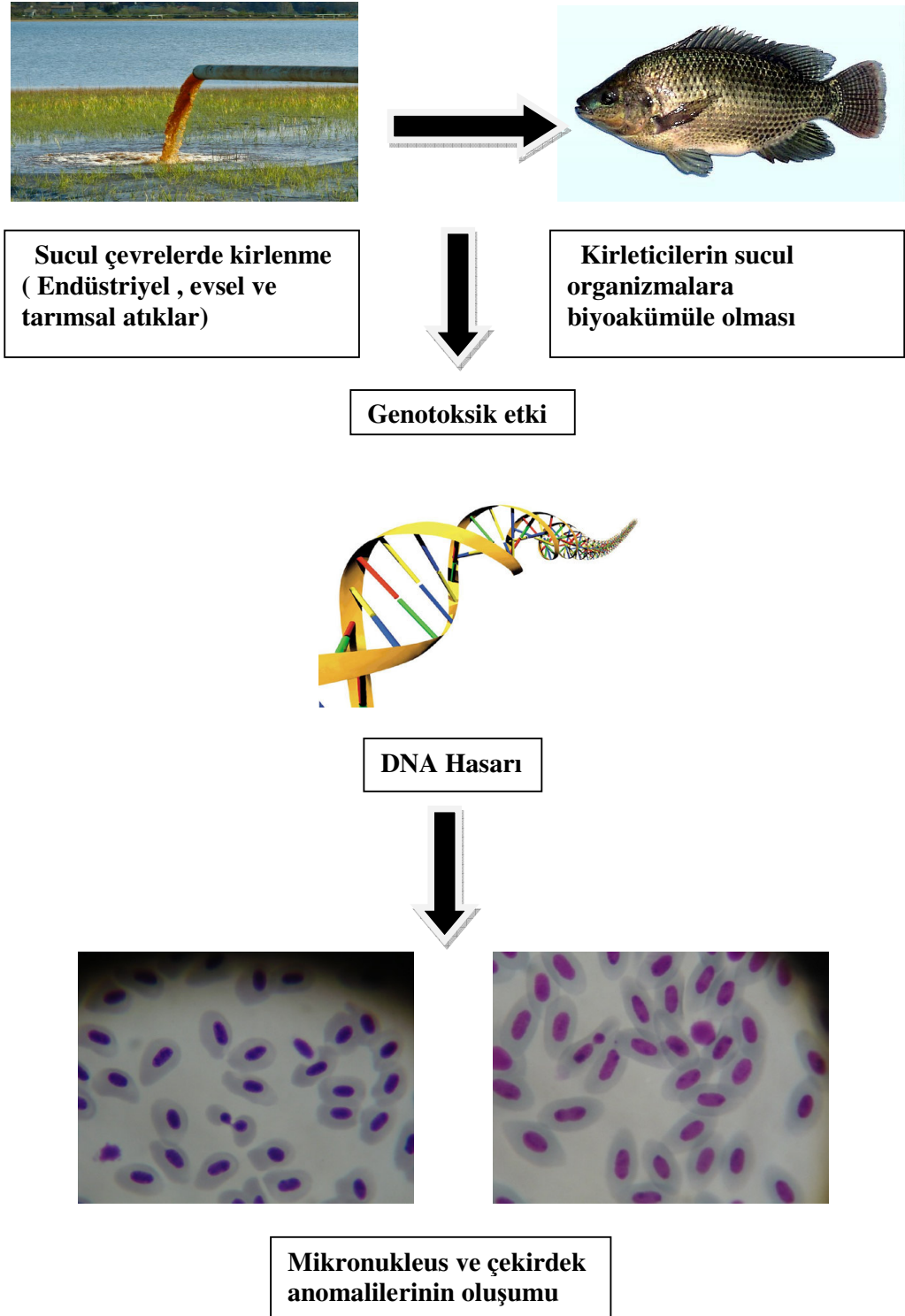
Farklı maddelerin balık türlerinde genotoksik etkilerini ölçmek için, intraperitoneal enjeksiyon metodu laboratuvar koşullarında en çok uygulanan metottur; çünkü kontrol edilmesi zor olan başka yöntemler kullanıldığında, ürünün absorpsiyon mekanizmalarını etkileyebilecek pek çok faktör vardır. Ancak bu yöntem balıklarda strese yol açmaktadır. Stres balıklarda metabolik değişikliklere de yol açabilir (Ayllon ve Garcia – Vasquez 2000).

Balık kromozomları küçük olduğu için metafaz kromozomlarında kromozom aberasyonlarını saptamak güçtür (Hayashi ve ark. 1998). Balık hücrelerinde artan mikronukleus frekansları hücrelerin farklı genotoksik kimyasallara ve onların kompleks bileşiklerine maruz bırakıldıktan sonra hem doğal ortamda hem de laboratuvar ortamında yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Çavaş ve ark. 2004).

Balık mikronukleus testi genotoksisitenin belirlenmesi için kullanışlı in vivo bir tekniktir ve su kalitesini belirlemek için kullanılabilir. Sonuçları iyi karakterize edilmiştir ve kolayca belirlenebilir. Bu teknik in situ ve laboratuvar koşullarında sıkça kullanılmaktadır (Pantaleao ve ark. 2006). Mikronukleus testi hem klastojenik hem de aneujenik etkileri belirler bu nedenle geniş aralıktaki bileşiklerin genotoksisitelerini belirleyebilir (Heddle ve ark. 1991).

Kirli suların genotoksisiteleri doğal su konsantrasyonlarında Salmonella testi gibi mikrobiyal yöntemlerle değerlendirilebildiği halde, balık ve diğer sucul organizmaları kullanan in situ analiz sistemleri daha uygundur. *In situ* mikronukleus analizleri balıklar ve denizkestanesi, mavi midye, istiridye, semender, su solucanı da içeren sucul organizmalar için geliştirilmiştir. Carrasco ve ark. 1990, De Flora ve ark. 1993 ve Al-

Sabti ve Metcalfe 1995'te yaptıkları çalışmalarda, hangi çoğalan hücre popülasyonlarının balıklardaki mikronukleus analizleri için daha uygun olduğunu değerlendirmişlerdir. Balıklarda, genellikle bu amaçla kullanılan eritrositler ya da çevresel kirleticilere direk maruz kalan solungaç hücrelerinin daha uygun olduklarını göstermişlerdir. Şekil 2.2'de Sucul çevrelerde meydana gelen kirlenme sonucunda mikronukleus ve çekirdek anomalilerinin oluşumu özetlenmiştir.



Şekil 2.2. Sucul çevrelerde meydana gelen kirlenme sonucunda mikronukleus ve çekirdek anomalilerinin oluşumu

Doğal balık populasyonlarında genotoksik etkenlere maruz kalma seviyelerini belirlemek amacıyla, balıkları canlı tutma problemi dışında, taze yakalanan bireylerden kolayca elde edilebilmeleri ve genetik hasar belirlemede aktif olarak bölünen dokular kullanma gerekliliği nedeniyle periferik lenfositler uygun hedef hücrelerdir. Sitogenetik çalışmalar için balık lenfosit kültürleri ile yapılan az sayıda çalışma mevcuttur (Ellingham ve ark. 1986).

Ellingham ve ark. (1986), yaptıkları çalışmada SCE kardeş kromatid değişimi analizini *Ospanu tau* balığında 5-bromodeoksiüridin (BrdUrd) içeren tamponda gerçekleştirmişlerdir. *Ospanu tau*'nun ve *Anguilla rostrata* (yılanbalığı) periferik lenfositlerinde, Mitomycin C ve ethylene dibromid gibi kimyasalların SCE ve kromozom aberasyonu oluşturduğunu belirlemişlerdir. *Ospanu tau* ve *Anguilla rostrata* Kuzey Amerika kıyılarında bol bulunan vahşi türlerdir ve toksikoloji çalışmaları için uygun olarak çalışılmışlardır (Ellingham ve ark. 1986).

Balıklarda genotoksisiteyi değerlendirmek için, ekosistemdeki güçlü etkileri ve canlı organizmalardaki biyoakümülyasyonları nedeniyle ağır metaller özellikle ilgi çekmektedir. Güncel çalışmalar, çevredeki karmaşık karışımlarda ağır metallerin genotoksik etkilerini belirlemede, bakteri gen mutasyon testleri ve memeli hücrelerindeki sitogenetik testlerin çok yeterli olmadığını göstermektedir (Ayllon ve Garcia-Vasquez 2000).

Ulusal ve uluslar arası toksikoloji raporlarında kadmiyum ve civa en toksik metaller olarak sınıflandırılmaktadır. Diğer toksisitelere ek olarak, pek çok çalışmada genotoksik etkileri olduğu da gösterilmiştir. Ancak kadmiyum ve civa bileşiklerinin *in vivo* genotoksisite testleri balıklarda çok az yapılmıştır. *Fundulus heteroclitus* da inorganik civa teratojenik etki göstermiş ve metil civa klorid'in kromozom aberasyonları ve mikronukleus oluşumuna neden olduğu bulunmuştur (Perry ve ark. 1988).

Mana ve Sadhukan (1986), *Oreochromis mossambicus* (siyah mozambik) da kadmiyum klorid'in mikronukleus oluşumuna yol açtığını göstermişlerdir.

Ayllon ve Garcia-Vasquez (2000), kadmiyum ve civanın iki balık türü, *Phoxinus phoxinus* (mini inci balığı) ve *Poecilia latipinna* (yelken kuyruklu molly) 'da genotoksik etkilerini ve bu iki türün laboratuvar genotoksisite testleri için hedef organizma olarak uygunluklarını çalışmışlardır. Bu çalışmada her iki balık türündeki eritrositlerde yüksek dozlarda anlamlı oranda çekirdek anomalileri gözlenmiştir.

Laboratuvar koşullarında ve doğal ortamda yapılan birçok çalışma farklı kirleticilerin balık periferik eritrositlerinde mikronukleus oranını önemli ölçüde artırdığını göstermiştir (Çavaş ve Ergene-Gözükara 2005b). Son yıllarda birçok çalışma genotoksik maddelere maruz bırakılan balık hücrelerinde mikronukleus dışında nuklear anomaliler göstermiştir. Genel olarak bu anomaliler genotoksik hasarın indikatörleri olarak düşünülmektedir. Bu nedenle rutin genotoksisite çalışmalarında MN testinin tamamlayıcısıdır (Talapatra ve Banerjee 2007). Bu çalışmada nuklear anomalilerin frekansları yemle beslenen çiftlik balığı *Labeo bata* da kontrol gruplarıyla karşılaştırıldıklarında oldukça yüksek bulunmuştur.

Bolognesi ve ark. (2006), deniz kirliliği için bir biyomarker olarak balık eritrositlerinde mikronukleus testi için belirli bir bölgeden alınan farklı balık türlerinde MN ve çekirdek anomalilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada *Scophthalmus maximus* u dialkyl phtalate, bisphenol A, tetrabromodiphenyl ether gibi denizde bulunan kimyasallara maruz bırakarak MN ve çekirdek anomalilerinde anlamlı artış gözlemlemişlerdir.

Talapatra ve Banerje (2007), Hindistan'da Doğu Calcutta bataklığında yaşayan *Labeo bata* balığının eritrositleri ve solungaç hücrelerinde mikronukleus ve nekrotik hücre, apoptik hücre, çentikli çekirdekli hücre ve çift çekirdekli hücre gibi çekirdek anomalilerine dayanarak genotoksisiteyi belirlemek üzere bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada kullanılan balıkların solungaç ve böbrek eritrositlerinde mikronukleus frekansında ve çekirdek anomalilerinde anlamlı artış belirlemişlerdir.

Deguchi ve ark. (2007), kıyı bölgelerinden toplanan sivilaştırılmış ve işlenmiş atıkların mikronukleus ve comet testi kullanarak Japon balığında mutajenik etkisini belirlemişlerdir.

Sucul çevrelerin kirlenmesinde, kentsel ve endüstriyel atıklarda bulunan ksenobiyotiklerin de katkısı vardır. Bu maddeler mutajenik veya genotoksik olabilirler ve sucul organizmalarda doğrudan ya da dolaylı olarak biriktirilerek DNA hasarına yol açabilirler (Caffetti ve ark. 2008).

Son çalışmalar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAHs) ve/veya aromatik aminler tarafından kontamine olan sularda ve sedimentlerde yaşayan balık popülasyonlarında görülen tümör oluşumu arasında bir ilişki olduğunu desteklemiştir. Salmonella testinde mutajenik oldukları ve memelilerde karsinojenik oldukları bilinen kimyasallar bu çalışmalarda belirlenmiştir. Balıkların genotoksik karsinojenlere maruz bırakılması ve oluşan tümör oranı arasındaki ilişkinin çalışılması balık dokularında meydana gelen genetik hasarın doğrudan değerlendirilmesine izin vermektedir (Maddock ve ark. 1986).

Ayrıca son yıllarda balıklarda yapılan genotoksisite çalışmalarında Comet testi de kullanılmaya başlanmıştır. Comet testi çevresel çalışmalarda global DNA hasarını belirlemek için kolay, hızlı, duyarlı ve uygun maliyetli bir tekniktir. Pek çok balıkta kimyasalların DNA hasarına neden olduğunu göstermek ve çevresel değerlendirme yapmak üzere kullanılmıştır (Gontijo ve ark. 2003, Deguchi ve ark. 2007). Deguchi ve ark. (2007) çalışmalarında atık sularla muamele edilen japon balığında (*Carasius auratus*) yüksek oranda DNA hasarı belirlemişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Bölgesi ve İstasyonların Belirlenmesi

Bursa ili sınırları içerisinde doğan (Uludağ'ın güney yamaçları, Keles İlçe merkezinin ~10 km kuzey-doğusu) ve yine Bursa ili sınırları içerisinde sonlanan (Karacabey Boğazı) Nilüfer Çayı'na, Uludağ'ın yamaçlarından ve vadinin güneybatısındaki yamaçlardan birçok yan dere (Sultaniye Deresi, Kaplıkaya Deresi, Ayvalı Dere, Hasanağa Deresi, Panayır Deresi, Cilimboz Deresi, Gökdere, Kurtkaya Deresi, Değirmendere, Yaylacıkdere, Deliçay) katılır (Dere ve ark. 2002). Uzunluğu ~168 km, ortalama su hacmi 458.848.800 m³/yıl, su toplama havzası 680 km², yıllık ortalama debisi 16,77m³/sn' dir (Dere ve ark. 2002).

Bu çalışmada Nilüfer çayının özellikle endüstriyel ve evsel atıklarla önemli ölçüde kirlendiği düşünülen üç farklı istasyondan (Çekrice, Buttım ve B.Balıkli) ve kontrol amaçlı olarak Nilüfer çayının kaynağına yakın bölgede bulunan Baraklı istasyonundan su örnekleri alınmıştır. Örneklerin alındığı istasyonlar Şekil 3.1.'de gösterilmiştir. Örneklerin alındığı istasyonların özellikleri şöyledir:

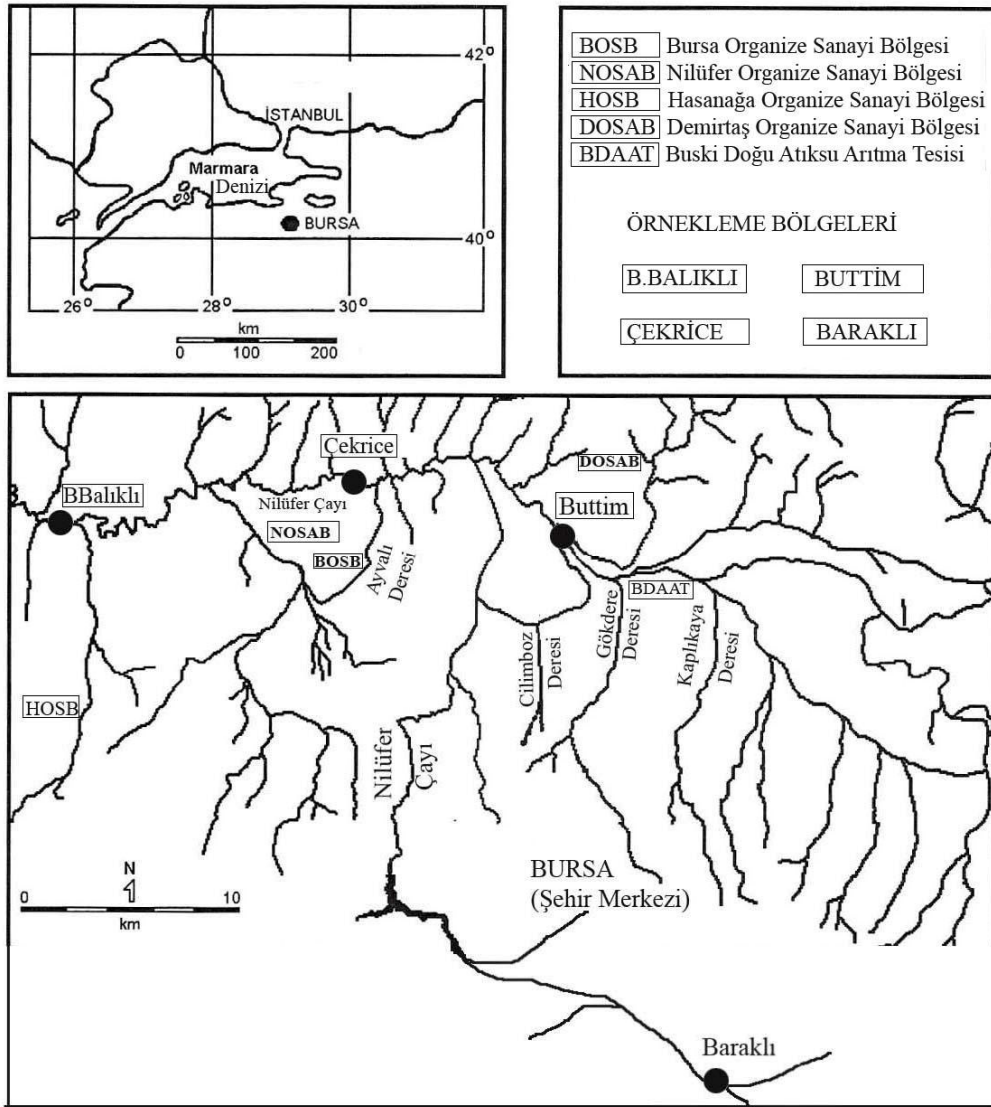
Baraklı istasyonu: İlk istasyon olup Uludağ'ın Güney eteklerinde, Nilüfer çayının kaynağının yakınındadır. Bu istasyonun suyu kaliteli içme suyudur ve atık içermez. Burada çayın tabanı ince kumdur ancak çakıl taşlarına da sıklıkla rastlanır.

Çekrice İstasyonu: Bu istasyondan alınan örnek Bursa Organize sanayi bölgesinin atık sularını içermektedir. %80 endüstriyel atık ve %20 evsel atıkların bulunduğu bir bölgedir.

Buttım istasyonu: Endüstriyel ve evsel atıkların %40- %60 oranında karıştığı bölgedir. Otomotiv ve tekstil endüstrisi atıklarından etkilenmektedir ayrıca Cilimboz

deresi vasıtasıyla deri tabaklama fabrikalarının atıkları da Buttım istasyonuna ulaşmaktadır.

Büyük Balıklı istasyonu: Hasanağa Organize Sanayi bölgesinden endüstriyel atıkların karıştığı bir bölgedir. Birçok dere, endüstriyel, tarımsal ve evsel atıkları B.Balıklı'dan önce Nilüfer çayına karışarak taşımaktadır.



Şekil 3.1. Nilüfer çayı üzerindeki örnek alınan bölgeler ve Bursa'da yer alan Sanayi bölgeleri

3.2. Su Örneklerinin Fiziksel ve Kimyasal Analizleri

Su örnekleri Nilüfer çayında belirlenen 4 istasyondan polietilen koyu renkli 20 lt'lik bidonlara alınmıştır. Tüm su örnekleri 2007 yılı Ağustos ayının ikinci yarısında alınıp oda sıcaklığında saklanmıştır.

Belirlenen istasyonlar Çizelge 3.1.'de gösterilmiş olup, istasyonlardan alınan su örneklerinin fiziksel ve kimyasal analizleri Bursa Büyükşehir Belediyesi BUSKİ Genel Müdürlüğü Doğu Atıksu Arıtma Tesisleri laboratuvarında yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Nilüfer çayının kaynağından ve belirlenen istasyonlardan alınan su örneklerinin fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları* (2007).

Parametre	Baraklı	Çekrice	Buttim	B.Balıkli
pH	7.80	7.74	8.46	8.04
Sıcaklık °C	18.5	29.5	24.7	25.8
BOD mg/l	4	185	138	160
DO mg/l	9.1	4.9	1.8	1.6
AKM mg/l	6	141	140	129
Al mg/l	0.177	0.638	1.714	1.567
Cd mg/l	0.002	0.006	0.009	0.003
Total Cr mg/l	0.006	0.323	0.067	0.312
Cu mg/l	0.000	0.102	0.031	0.039
Total Fe mg/l	0.323	>20	3.067	2.778
Ni mg/l	0.005	0.183	0.018	0.066
Pb mg/l	0.020	0.183	0.097	0.129
Zn mg/l	0.000	1.849	0.287	0.153
NH3-N mg/l	0.750	6.75	13.25	10.00
NO2-N mg/l	0.008	0.259	0.081	0.013
NO3-N mg/l	0.7	2.5	2.2	1.6

BOD: Biyolojik oksijen ihtiyacı, DO: Çözünmüş Oksijen, AKM: Askıda Katı madde.

* Analiz sonuçları Bursa Büyükşehir Belediyesi Arıtma Tesisleri Daire Başkanlığından alınmıştır.

3.3. Çalışmada Kullanılan Organizmanın Seçilmesi

Çalışmada Türkiye’de pek çok balık çiftliğinde ve göllerde kolaylıkla bulunabilen *Oreochromis niloticus* (İsrail sazani, Familya Cichlidae) seçilmiştir. Ortalama 200 ± 5 gr ağırlığında ve $20 \pm 1,5$ cm uzunluğunda *O. niloticus* numuneleri Gölyazı Köyü Abilyont (Bursa, Türkiye) gölünden alınmıştır. Diğer türlere oranla düşük kromozom sayısı ($2n=46$), toksik kimyasallara karşı duyarlılığı nedeniyle bu tür, MN testi için uygun bir model organizmadır (Ergene ve ark. 2007).

Deneye başlamadan önce balıklar durgun çeşme suyu içeren havuzlarda 2 ay bekletilerek ortama uyumları sağlanmıştır. Nilüfer çayından alınan su örneklerinin çeşitli konsantrasyonlarına maruz bırakmak için 25°C ’ de 12 saat ışık- 12 saat karanlık koşullardaki 90 lt’ lik akvaryumlarda, aynı anda iki akvaryumda deneyler gerçekleştirilmiştir. Her konsantrasyon ve zaman uygulaması için 4 balık kullanılmıştır. Balıklar su örneklerine % 10 ve % 20’lik konsantrasyonlarda, 3 ve 6 gün olmak üzere iki farklı sürede maruz bırakılmıştır. % 20’nin üzerindeki konsantrasyonlarda ve 6 günden daha uzun süre balıklar yaşamadığı için bu dozlar seçilmiştir. Ayrıca balıkların yaşadığı doğal göl ortamında 4 balıktan kan alınıp anında yayma preparat hazırlanıp balıklardaki mikronukleus oranı belirlenmiştir. Her balık için 5’er preparat hazırlanmış ve doz denemeleri dışında toplam 60 balık kullanılmıştır.

3.4. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Periferik kan örnekleri kuyruk yüzgecinden alınarak balık başına 4 preparat olacak şekilde önceden alkolde temizlenmiş lamlar üzerine yayma yapıldı. Kan hücrelerini temizlenmiş lamlara fikse etmek için 100% saf alkolde 20 dk bekletildi ve daha sonra havada kurutuldu. Havada kurutulmuş preparatlar Al-Sabti ve Metcalfe (1995)’in yöntemine göre boyandı. Boyama için %5’lik Giemsa hazırlandı.

Boyanın Hazırlanması:

18gr NA_2HPO_4 1000ml’ye ve 0.685gr KH_2PO_4 500ml’ye distile su ile tamamlanarak boya için gerekli olan çözeltiler hazırlandı.

52ml 0,1M Na_2HPO_4 çözeltisi ile 48ml 0.075M KH_2PO_4 çözeltisinden hazırlanan karışımın 95ml'sinin üzerine 5ml Giemsa boyası konularak %5' lik Giemsa boyası hazırlandı.

Hazırlanan boyada preparatlar 30dk bekletilip, distile sudan geçirildi ve havada kurutuldu.

3.5. Mikronukleus Testi ve Çekirdek Anomalilerinin Analizi

Eritrositlerdeki çekirdek anomalileri Carrasco ve ark. (1990) çalışmasına göre sınıflandırıldı. Mikronukleus ve çekirdek anomalilerinin değerlendirilmesi için balık başına 1000 eritrosit ışık mikroskopunda 100x büyütmede sayıldı ve fotoğraflandı. Tüm preparatlar kodlandı ve körlemesine sayıldı. Ana çekirdekle aynı boyayı veren küçük, parlamayan, dairesel kromatin cisimcikleri mikronukleus olarak değerlendirildi.

Eritrositlerde mikronukleusun dışında çekirdek anomalileri dört gruba ayrılır. Özet olarak iki nükleusa sahip olan hücreler binükleid (çift çekirdekli) olarak adlandırılır. Blebbed nükleidler (tomurcuklu), çekirdek membranından küçük çıkıntılar olup kromatin içeren çıkıntılar olarak gözlenebilirler. Tomurcuklu çekirdeklerden daha büyük çıkıntılara sahip ve loplu bir görüntü sergileyen nükleuslar lobbed nükleus (loplu) olarak tanımlanır. Vakuelleri olan veya nükleusun içeriye doğru girinti yaptığı nükleuslara notched nükleus (çentikli) adı verilir. Çekirdek anomalisi verileri tüm çekirdek anomalilerinin toplamına göre değerlendirilir (Çavaş ve Könen 2008).

3.6. İstatistiksel Yöntem

İstasyonların kendi aralarındaki konsantrasyon ve zaman değerlendirmeleri çoklu varyans analizi (MANOVA) ile gerçekleştirildi. Fark grupları Tukey HSD testi kullanılarak değerlendirildi. Tüm istatistiksel analizler SPSS 11.5 bilgisayar programı ile yapıldı.

4. SONUÇLAR

İstasyonlardan alınan su örneklerinin kimyasal analizlerinde Nilüfer çayının ovadaki kısımlarından yani B.Balıkli ve Buttım istasyonlarından alınan örneklerde nispeten yüksek oranda ağır metaller belirlendi ve askıda maddeler görüldü. Çekrice istasyonu Nilüfer ve Bursa Organize Sanayi bölgelerine yakın bir konumda yer almaktadır. Bu sanayi bölgelerinde yer alan otomotiv yan sanayi ve tekstil fabrikalarının atıkları arıtılmadan yan kollar aracılığı ile Nilüfer çayının Çekrice bölgesine ulaşmaktadır. Bu sebeplerle Çekrice'den alınan su örneğinde çeşitli ağır metallerin düzeyinin oldukça yüksek olduğu belirlendi. Çayın kaynağa yakın kısmı olan Baraklı bölgesinden alınan su örneğinde oldukça düşük oranda ağır metal ve askıda katı madde belirlendi (Çizelge 3.1). Çalışmada, tüm istasyonlarda, farklı konsantrasyon ve muamele zamanları sonucunda balıklardan elde edilen tüm mikronukleus ve çekirdek anomalileri verileri ve ortalama değerleri Çizelge 4.1'de verildi. Tüm istatistik değerlendirmelerin sonuçları ise Çizelge 4.2'de verildi. Çalışmadan elde edilen farklı istasyon ve konsantrasyonlarla muamele sonucunda elde edilen mikronukleus ve çekirdek anomali oranları 3 ve 6 günlük muamele zamanlarına göre çizilen grafiklerde sırasıyla Şekil 4.1. ve 4.2.' de gösterildi.

Çoklu varyans analizi ile tüm istasyonların tüm konsantrasyonları ve muamele zamanları mikronukleus frekansı açısından karşılaştırıldığında önemli bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$; Çizelge 4.2). Ancak konsantrasyon ve muamele zamanını sabit tutarak sadece istasyonlardaki mikronukleus oranlarını ele aldığımızda istasyonlar arasında önemli farklılık bulundu ($p<0,001$; Çizelge 4.2).

Kontrol olarak kullandığımız Baraklı istasyonundaki mikronukleus oranı ile çekrice istasyonundaki mikronukleus oranındaki artış arasında Tukey HSD testi ile istatistiksel önemli bir farklılık yoktur ($p>0,05$; Çizelge 4.2). Ancak Baraklı ile Buttım ve Baraklı ile B.Balıkli istasyonlarındaki mikronukleus oranındaki artış istatistiksel

olarak önemlidir (Sırasıyla $p < 0,01$ ve $p < 0,001$; Çizelge 4.2). İstasyonları kendi aralarında mikronukleus artış oranı açısından karşılaştırdığımızda Çekrice istasyonuna göre Buttım istasyonunda daha yüksek bir mikronukleus artışı gözlemlendi ($p < 0,05$). Çekrice istasyonu ile B.Balıkli istasyonundaki mikronukleus oranındaki artış karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak yüksek önemli bir artış gözlemlendi ($p < 0,001$). Son olarak Buttım ile B.Balıkli istasyonlarındaki mikronukleus oranlarındaki artış önemli bulunmadı ($p > 0,05$; Çizelge 4.2). Çalışmada gözlenen mikronukleus örneklerine ait resimler Şekil 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.10'da verildi.

Çekirdek anomalilerinden çentikli çekirdek açısından çoklu varyans analizi ile karşılaştırdığımızda tüm istasyonlardaki farklı konsantrasyonlar arasında önemli bir farklılık bulunmadı ($p > 0,05$; Çizelge 4.2). Farklı muamele zamanları bakımından da yine tüm istasyonlarda çentikli çekirdek sayısı açısından önemli bir farklılık bulunamadı ($p > 0,05$; Çizelge 4.2). Sadece istasyonlar bakımından karşılaştırma yapıldığında çentikli çekirdek oranlarında konsantrasyon ve muamele zamanları sabit tutulduğunda istasyonlar arasında önemli farklılık bulundu ($p < 0,001$). Konsantrasyon, muamele zamanı ve örnekleme istasyonları bir arada alındığında çentikli çekirdek oranındaki artış önemsiz bulundu ($p > 0,05$; Çizelge 4.2).

Baraklı istasyonu ile karşılaştırıldığında Çekrice, Buttım ve B.Balıkli istasyonlarındaki çentikli çekirdek anomalisi oranındaki artış, konsantrasyon ve muamele zamanına bakılmaksızın Tukey HSD testi ile önemli bulundu (Sırasıyla $p < 0,05$; $p < 0,001$ ve $p < 0,001$; Çizelge 4.2). Çekrice istasyonu ile Buttım ve Çekrice ile B.Balıkli istasyonları arasında çentikli çekirdek anomalisi oranındaki artış önemli bulundu (Sırasıyla $p < 0,01$; $p < 0,001$; Çizelge 4.2). Ancak Buttım istasyonu ile B.Balıkli istasyonu arasında çentikli nukleus anomalisi oranı açısından önemli bir farklılık bulunmadı ($p > 0,05$; Çizelge 4.2). Çalışmada görülen çentikli çekirdek anomalilerine ait resimler Şekil 4.4, 4.5 ve 4.6'da verildi.

Çoklu varyans analizi ile tomurcuklu çekirdek anomalisi oranlarının tüm istasyonlardaki konsantrasyon ve muamele zamanları açısından önemli farklı olmadığı bulundu ($p > 0,05$; Çizelge 4.2). Konsantrasyon ve muamele zamanlarını göz önüne

almaksızın istasyonlardaki tomurcuklu çekirdek anomali oranlarını karşılaştırdığımızda önemli bir farklılık bulundu ($p < 0.01$; Çizelge 4.2).

Baraklı ile Çekrice istasyonları Tukey HSD testi ile tomurcuklu çekirdek anomali açısından karşılaştırıldı ve aralarında önemli farklılık bulundu ($p < 0,01$; Çizelge 4.2). Baraklı ile Buttım ve B.Balıkli istasyonlarındaki tomurcuklu çekirdek anomali oranları arasında önemli bir artış gözlenmedi ($p > 0,05$; Çizelge 4.2). Çekrice ve Buttım istasyonları arasındaki tomurcuklu çekirdek anomali oranlarında önemli bir artış bulunmadı ($p > 0,05$; Çizelge 4.2). Çekrice istasyonu ile B.Balıkli istasyonundaki tomurcuklu çekirdek anomali oranları arasında önemli bir farklılık bulundu ($p < 0,05$; Çizelge 4.2). Buttım ve B.Balıkli istasyonları arasında tomurcuklu çekirdek anomali oranları arasında önemli bir farklılık bulunmadı ($p > 0,05$; Çizelge 4.2). Çalışmada gözlenen tomurcuklu çekirdek anomalisine ait resim Şekil 4.7 ve 4.12'de verildi.

Loplu çekirdek anomali bakımından tüm istasyonlar, konsantrasyonlar ve muamele zamanları çoklu varyans analizi ile karşılaştırıldığında aralarında önemli bir farklılık bulunmadı ($p > 0,05$; Çizelge 4.2).

Nükleoplazmik köprülü çift çekirdekli eritrositler açısından çoklu varyans analizi ile tüm konsantrasyonlar ve muamele zamanı bakımından değerlendirme yapıldığında aralarında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p > 0,05$; Çizelge 4.2). İstasyonlar bakımından çoklu varyans analizi ile değerlendirildiğinde ise anlamlı bir farklılık bulundu ($p < 0,001$; Çizelge 4.2).

Konsantrasyon ve muamele zamanları sabit tutularak istasyonlar arasında nükleoplazmik köprülü çift çekirdekli eritrosit oranı bakımından Tukey HSD testi ile karşılaştırma yapıldığında Baraklı ile Çekrice ve Baraklı ile Buttım istasyonları arasında önemli farklılık gözlenmedi ($p > 0,05$; Çizelge 4.2). Baraklı ile B.Balıkli istasyonları arasında yapılan karşılaştırma sonucunda nükleoplazmik köprülü çift çekirdekli eritrosit oranları arasında önemli farklılık bulundu ($p < 0,001$; Çizelge 4.2). Çekrice ile Buttım istasyonları arasında da önemli farklılık bulunmadı ($p > 0,05$; Çizelge 4.2). Ancak Çekrice ile B.Balıkli istasyonundaki nükleoplazmik köprülü çift çekirdekli eritrosit

oranları bakımından önemli farklılık vardı ($p<0,001$; Çizelge 4.2). Buttım ve B.Balıklı istasyonlarındaki nükleoplazmik köprülü çift çekirdekli eritrosit oranı önemli farklı bulundu ($p<0,05$; Çizelge 4.2). Çalışmada görülen nükleoplazmik köprülü çift çekirdekli eritrositlere ait resimler Şekil 4.9 ve 4.10'da verildi.

Çift çekirdekli eritrosit oranı bakımından tüm konsantrasyonlar ve muamele zamanları çoklu varyans analizi ile karşılaştırılmış ve aralarında önemli bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$; Çizelge 4.2). Ancak istasyonlar arası çift çekirdekli eritrosit oranlarında önemli bir farklılık çoklu varyans analizi ile belirlendi ($p<0,05$; Çizelge 4.2).

Konsantrasyon ve muamele zamanları sabit tutularak istasyonlar arasında çift çekirdekli eritrosit oranı bakımından Tukey HSD testi ile karşılaştırma yapıldığında Baraklı ile Çekrice istasyonu arasında önemli bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$; Çizelge 4.2). Baraklı istasyonu ile Buttım ve B.Balıklı istasyonları arasında ise çift çekirdekli eritrosit oranı bakımından önemli farklılık gözlemlendi (Sırasıyla $p<0,01$; $p<0,01$; Çizelge 4.2). Çekrice ile Buttım ve B.Balıklı istasyonları arasında çift çekirdekli eritrosit oranları açısından önemli farklılık bulunmadı ($p>0,05$; Çizelge 4.2). Buttım ve B.Balıklı istasyonları arasında çift çekirdekli eritrosit oranları karşılaştırıldığında önemli farklılık gözlemlenmedi ($p>0,05$; Çizelge 4.2). Çalışmada görülen çift çekirdekli eritrositlere ait resimler Şekil 4.11 ve 4.12'de verildi.

Total çekirdek anomalisi oranları tüm istasyonlardaki konsantrasyonlar kendi aralarında çoklu varyans analizi ile karşılaştırıldığında, konsantrasyonlar arasında önemli bir farklılık bulundu ($p<0,05$; Çizelge 4.2). Muamele zamanları göz önüne alındığında istasyonlar arasında önemli bir farklılık ($p>0,05$) bulunmamakla beraber istasyonlar arasında total çekirdek anomalisi bakımından önemli bir farklılık gözlemlendi ($p<0,05$; Çizelge 4.2).

Baraklı istasyonu ile karşılaştırıldığında Çekrice, Buttım, B.Balıklı istasyonlarındaki total çekirdek anomali oranlarındaki artış Tukey HSD testine göre önemli bulundu ($p<0,001$; Çizelge 4.2). Çekrice ile Buttım ve B.Balıklı istasyonları arasında da aynı

kriter açısından önemli farklılık bulunmadı ($p>0,05$; Çizelge 4.2). Buttım ve B.Balıkli istasyonları arasında total çekirdek anomalisi oranları açısından önemli bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$; Çizelge 4.2).

Çizelge 4.1. Nilüfer Çayının üzerinden çeşitli istasyonlardan alınan su örneklerine maruz bırakılmış balıklardaki mikronukleus ve çekirdek anomali verileri ve ortalama değerler

İstasyon	Konsantrasyon (%)	Muamele Zamani (Gün)	Balık No	Toplam Hücre Sayısı	Mikronukleus (MN)	Çentikli	Tomurcuklu	Loplu	Nükleoplazmik Köprülü Çift Çekirdekli	Çift çekirdekli	Total çekirdek anomali		
BARAKLI	3		1	1000	0	2	1	7	1	0	11		
			2	1000	0	1	2	0	0	0	3		
			3	1000	1	1	3	10	10	3	27		
			4	1000	1	0	2	0	2	0	4		
	Ort.± SD				0.50±0.57	1.00±0.82	2.00±0.82	4.25±5.06	0.75±1.50	1.00±0.82	9.00±6.98		
	6			1	1000	2	3	8	0	1	0	12	
				2	1000	0	3	5	5	0	4	17	
				3	1000	0	3	9	1	0	0	13	
				4	1000	0	3	2	1	0	0	6	
	Ort.± SD				0.50±1.00	3.00±0.00	6.00±3.16	1.75±2.21	1.00±2.00	0.25±0.50	12.00±4.54		
	ÇEKİRİCE	10%		3	1	1000	1	5	32	0	1	0	38
					2	1000	2	4	6	1	0	0	11
3					1000	3	8	7	16	6	4	41	
4					1000	0	7	5	19	15	5	51	
Ort.± SD				1.50±1.29	6.00±1.82	12.50±13.03	9.00±9.89	2.25±2.63	5.50±6.86	35.25±17.09			
6				3	1	1000	2	14	19	7	20	8	68
					2	1000	1	11	24	7	8	0	50
					3	1000	1	10	6	1	0	4	21
					4	1000	2	2	12	5	0	0	19
Ort.± SD				1.50±0.58	9.25±5.12	15.25±7.89	5.00±2.83	3.00±3.83	7.00±9.45	39.50±23.69			
20%		3			1	1000	1	15	31	8	1	0	55
					2	1000	0	2	4	6	4	1	17
	3				1000	2	2	12	1	0	0	15	
	4				1000	1	2	14	22	0	0	38	
	Ort.± SD				1.00±0.82	5.25±6.50	15.25±11.36	9.25±8.99	0.25±0.50	1.25±1.89	30.75±18.73		
	6			3	1	1000	3	6	18	10	0	0	34
					2	1000	0	2	11	8	9	9	39
					3	1000	3	2	10	8	0	0	20
4					1000	0	13	16	4	0	0	33	
Ort.± SD				1.50±1.73	5.75±5.19	13.75±3.86	7.50±2.52	2.25±4.50	2.25±4.50	31.50±8.10			

Çizelge 4.1. Devam

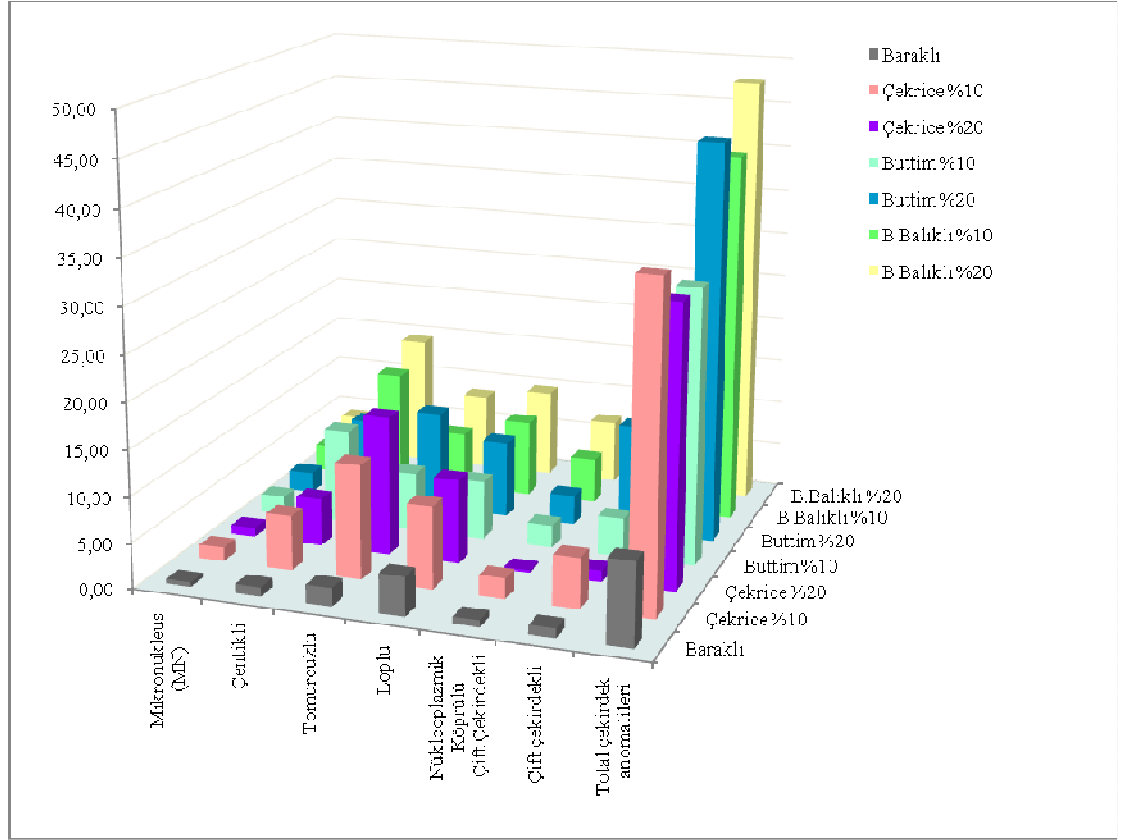
İstasyon	Konsantrasyon (%)	Zaman (Gün)	Batık No	Toplam Hücre Sayısı	Mikronukleus (MN)	Çentikli	Tomurcuklu	Loplu	Nükleoplazmik Köprülü Çift Çekirdekli	Çift çekirdekli	Total çekirdek anomali	
B.UYUM	10%	3	1	1000	0	10	8	5	1	1	25	
			2	1000	1	8	8	7	12	5	40	
			3	1000	2	11	5	7	2	2	27	
			4	1000	5	13	5	7	2	2	29	
		Ort.± SD				2.00±2.16	10.50±2.08	6.50±1.73	6.50±1.00	2.50±1.73	4.25±5.18	30.25±6.70
		6	1	1000	3	13	10	10	3	3	39	
			2	1000	4	8	11	12	4	3	38	
			3	1000	2	12	10	13	3	2	40	
	4		1000	2	5	8	5	4	2	24		
	Ort.± SD				2.75±0.96	9.50±3.69	9.75±1.26	10.00±3.56	2.50±0.57	7.00±9.45	35.25±7.54	
	20%	3	1	1000	0	7	15	6	15	4	47	
			2	1000	1	8	12	13	8	2	43	
			3	1000	3	10	7	7	6	2	32	
			4	1000	5	12	10	8	19	5	54	
		Ort.± SD				2.25±2.22	9.25±2.22	11.00±3.37	8.50±3.10	3.25±1.50	12.00±6.06	44.00±9.20
		6	1	1000	3	10	8	15	16	7	56	
2			1000	2	13	12	12	14	3	54		
3			1000	5	18	14	15	4	3	54		
4	1000		6	13	11	12	4	5	45			
Ort.± SD				4.00±1.83	13.50±3.32	11.25±2.50	13.50±1.73	4.50±1.92	9.50±6.40	52.25±4.93		
B.BALIKLI	10%	3	1	1000	3	13	7	8	12	4	44	
			2	1000	2	10	6	5	7	3	31	
			3	1000	3	12	7	10	9	7	45	
			4	1000	4	15	5	11	7	6	44	
		Ort.± SD				3.00±0.82	12.50±2.08	6.25±0.96	8.50±2.65	5.00±1.83	8.75±3.36	41.00±6.68
		6	1	1000	2	13	4	5	6	3	31	
			2	1000	3	10	8	8	7	4	37	
			3	1000	5	11	7	6	8	2	34	
	4		1000	3	18	6	8	9	3	44		
	Ort.± SD				3.25±1.26	13.00±3.56	6.25±1.70	6.75±1.50	3.00±0.82	7.50±1.29	36.50±5.57	
	20%	3	1	1000	3	17	9	8	9	4	47	
			2	1000	4	11	8	8	6	9	42	
			3	1000	5	16	9	11	9	8	53	
			4	1000	5	14	8	12	8	7	49	
		Ort.± SD				4.25±0.96	14.50±2.65	8.50±0.58	9.75±2.06	7.00±2.16	8.00±1.42	47.75±4.57
		6	1	1000	4	13	8	10	7	7	45	
2			1000	5	12	9	12	8	9	50		
3			1000	8	17	12	10	9	8	56		
4	1000		5	13	14	12	8	7	54			
Ort.± SD				5.50±1.73	13.75±2.17	10.75±2.75	11.00±1.15	7.75±0.96	8.00±0.82	51.25±4.86		

Çizelge 4.2. Çalışmada elde edilen verilerin çoklu varyans analizi ile karşılaştırılması sonucunda elde edilen F değerleri ve istatistiksel anlamlılık sonuçları

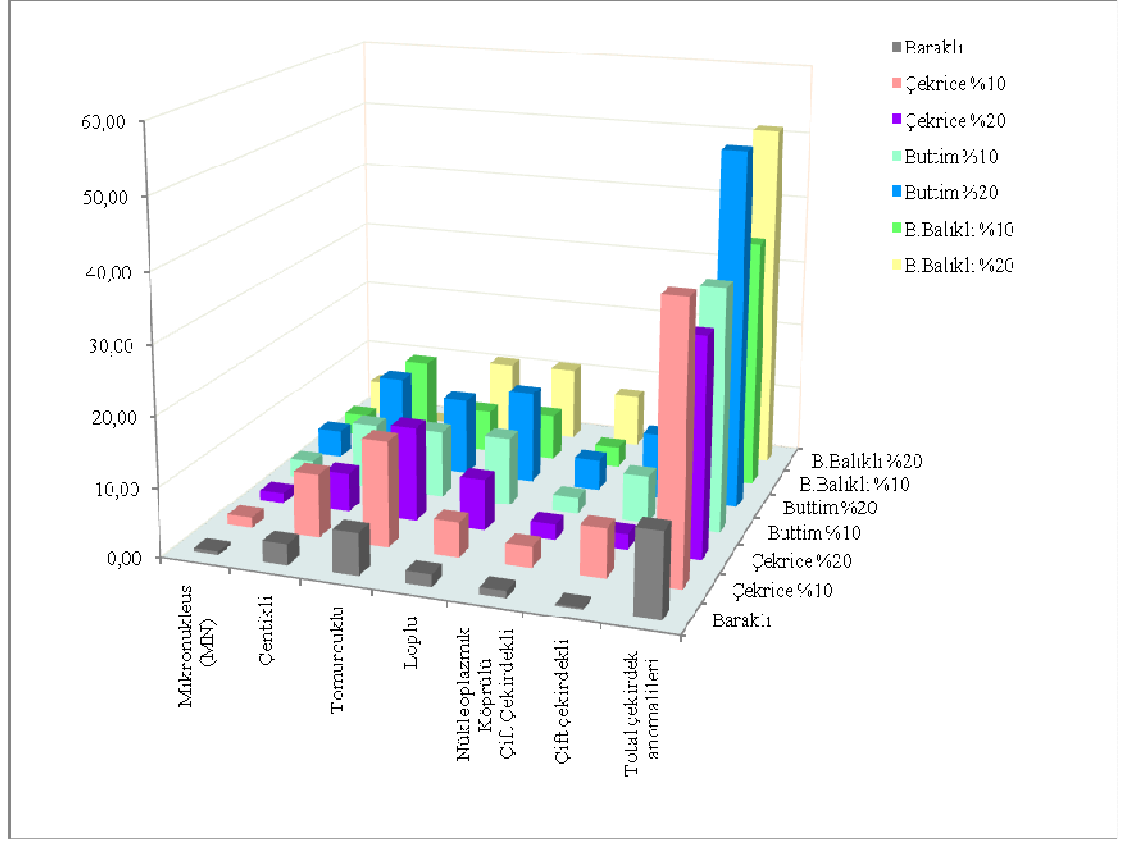
	Mikronukleus (MN)		Çentikli Ç.E.		Tomurcuklu Ç.E.		Loblu Ç.E.		Nükleoplazmik Köprülü Çift Çekirdekli		Çift Çekirdekli		Total Çekirdek Anomalileri	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Konsantrasyon (%)	3,50	>0,05	0,05	>0,05	2,18	>0,05	3,33	>0,05	3,17	>0,05	0,34	>0,05	4,41	<0,05*
Muamele Zamanı (Gün)	2,10	>0,05	1,99	>0,05	1,50	>0,05	0,08	>0,05	0,44	>0,05	0,13	>0,05	0,91	>0,05
İstasyon	14,30	<0,001*	16,53	<0,001*	5,57	<0,01*	0,83	>0,05	12,16	<0,001*	3,80	<0,05*	3,34	<0,05*
Kons. Ve Zaman	1,08	>0,05	0,05	>0,05	0,28	>0,05	0,81	>0,05	1,92	>0,05	0,02	>0,05	0,17	>0,05
Zaman ve İstasyon	0,52	>0,05	0,41	>0,05	0,04	>0,05	2,75	>0,05	0,85	>0,05	0,43	>0,05	0,43	>0,05
Kons. Ve İstasyon	2,07	>0,05	1,41	>0,05	0,30	>0,05	0,13	>0,05	4,74	<0,05*	6,68	<0,01*	4,35	<0,05*
Kons. Zaman ve İstasyon	0,04	>0,05	1,56	>0,05	0,40	>0,05	0,03	>0,05	0,16	>0,05	0,12	>0,05	0,28	>0,05

Ç. E.; Çekirdekli eritrosit, Kons; Konsantrasyon.

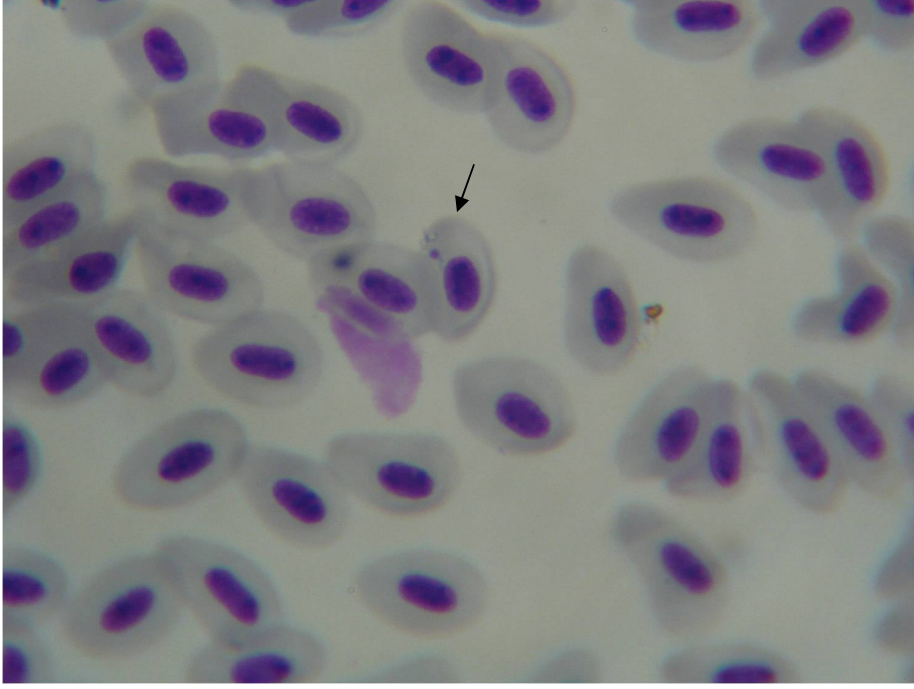
* İstatistiksel anlamlı



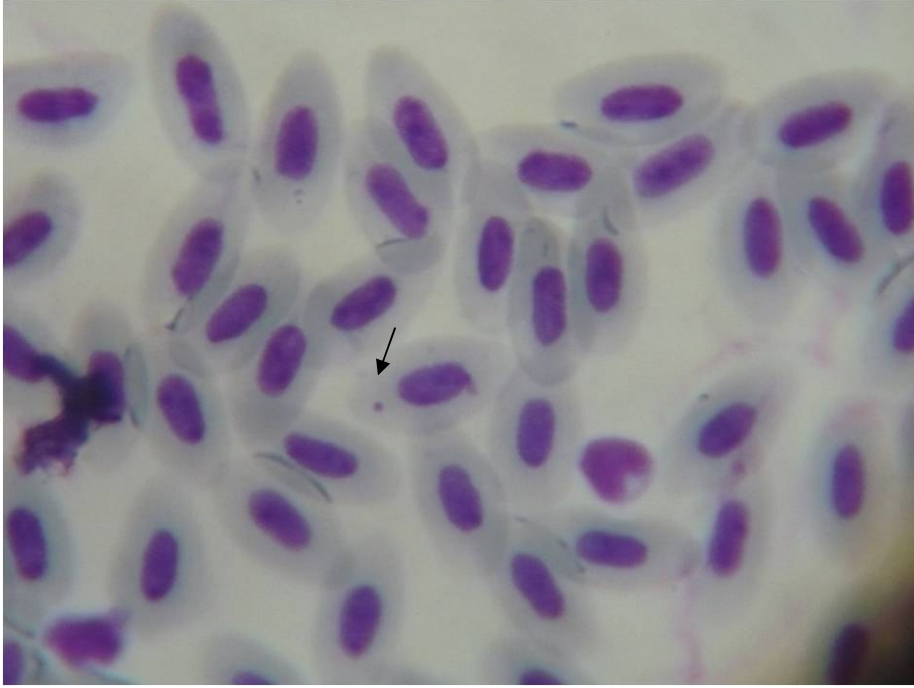
Şekil 4.1. : Kontrol ve diğer istasyonların %10 ve %20 konsantrasyonlardaki örneklerinde 3 günlük muamele zamanında elde edilen mikronukleus ve total çekirdek anomalisi oranları



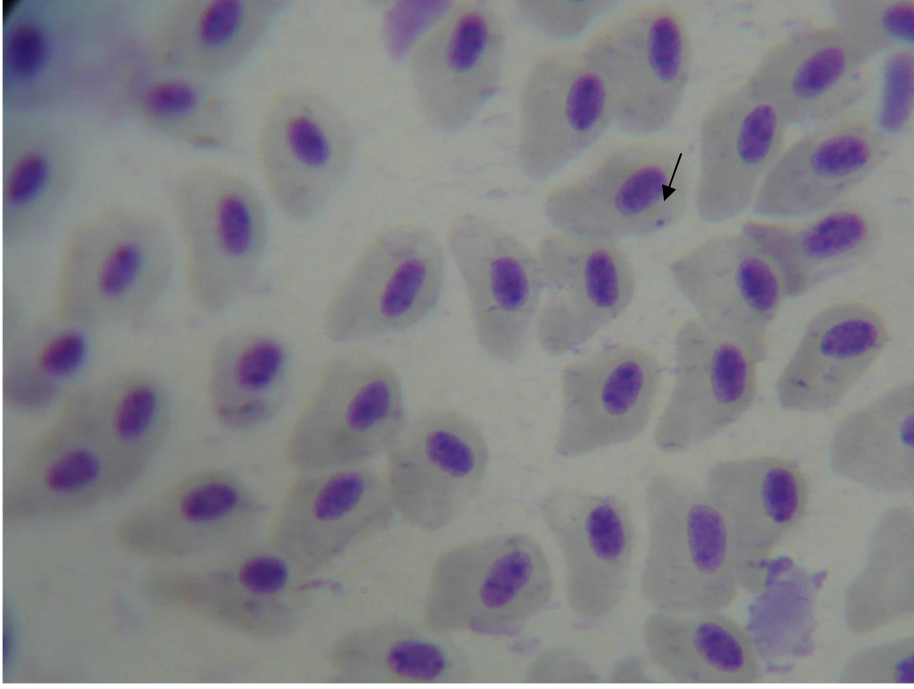
Şekil 4.2. : Kontrol ve diğer istasyonların %10 ve %20 konsantrasyonlardaki örneklerinde 6 günlük muamele zamanında elde edilen mikronukleus ve total çekirdek anomalisi oranları



Şekil 4.3. Çekrice istasyonundan alınan su örneklerinde mikronukleuslu eritrosit



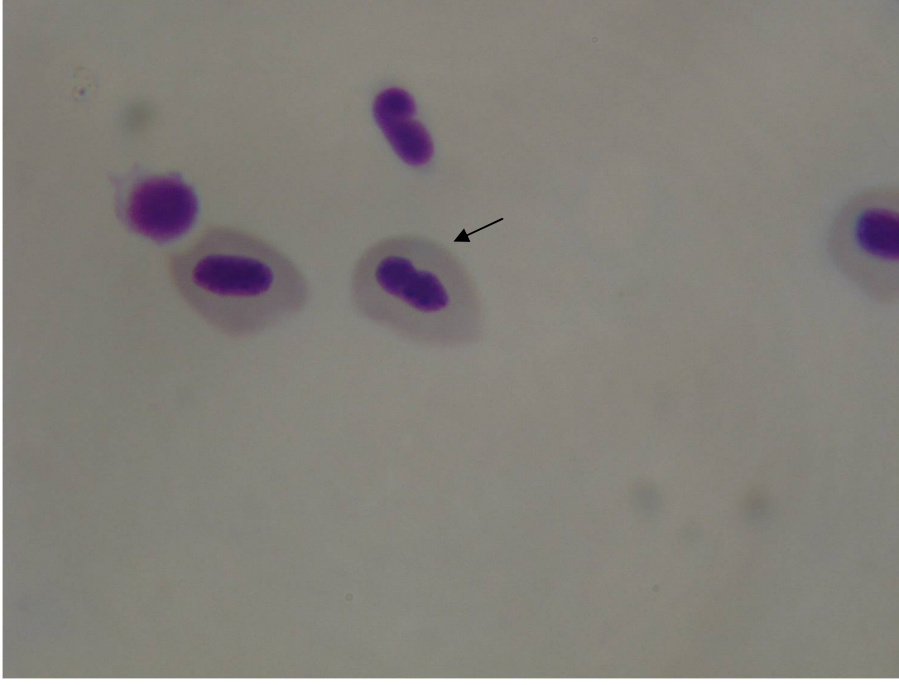
Şekil 4.4. Buttım istasyonundan alınan su örneklerinde mikronukleuslu eritrosit



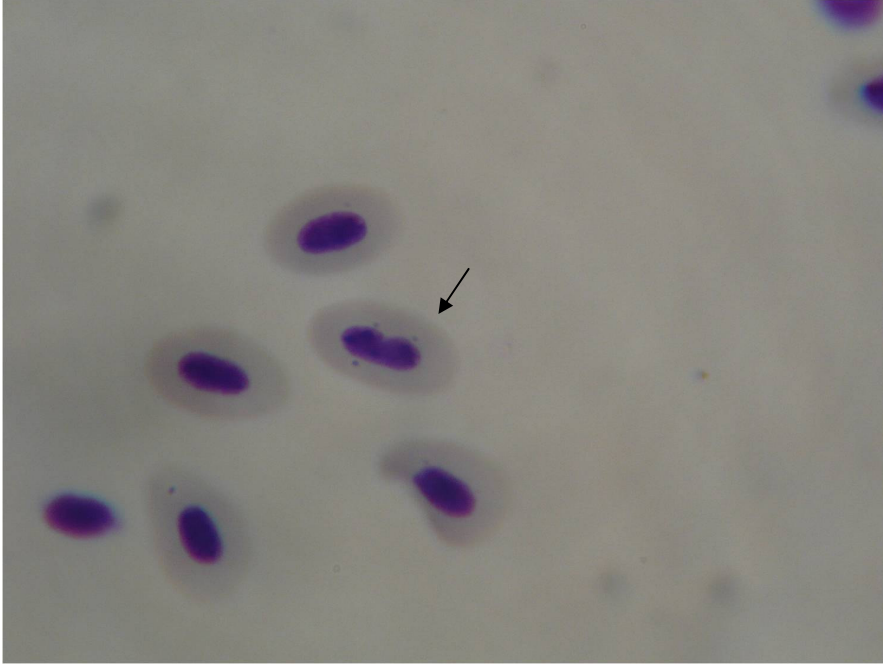
Şekil 4.5. B.Balıkli istasyonundan alınan örneklerde mikronukleuslu eritrosit



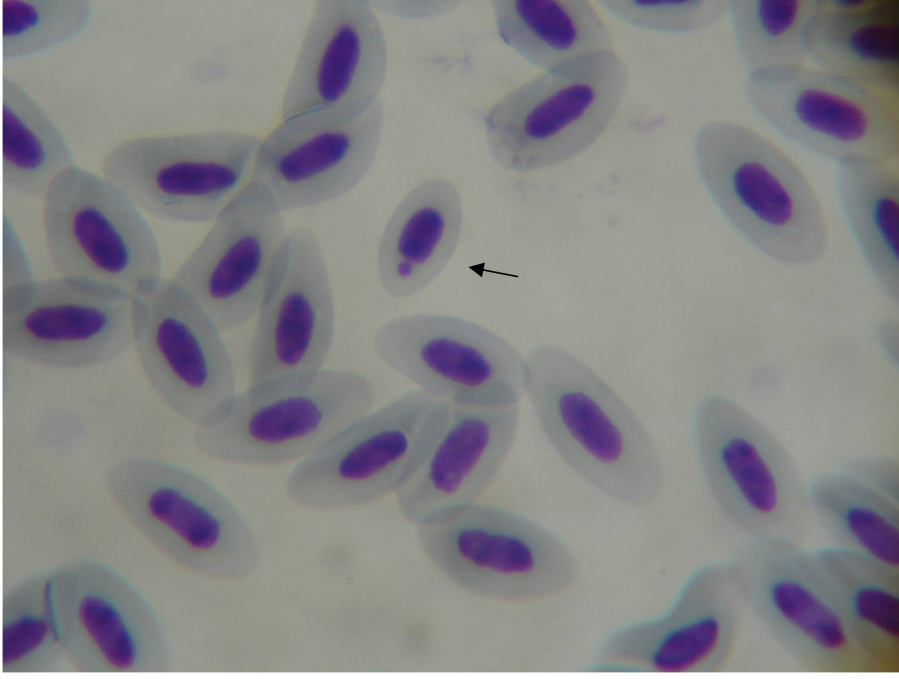
Şekil 4.6. Çekrice istasyonundan alınan örneklerde çentikli (notched) nukleuslu eritrosit



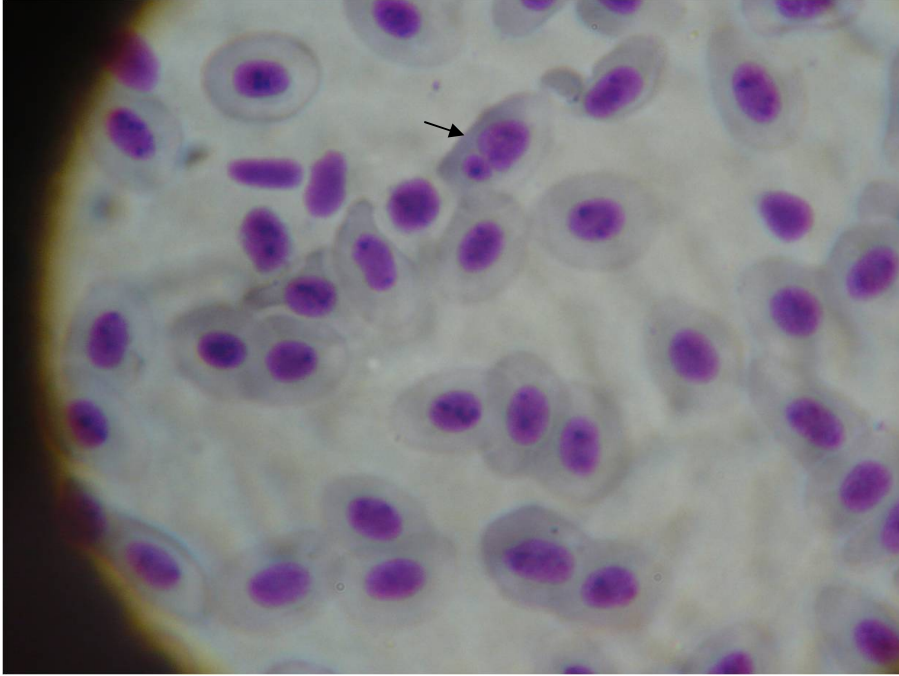
Şekil 4.7. Buttım istasyonundan alınan örneklerde çentikli (notched) nukleus içeren eritrosit



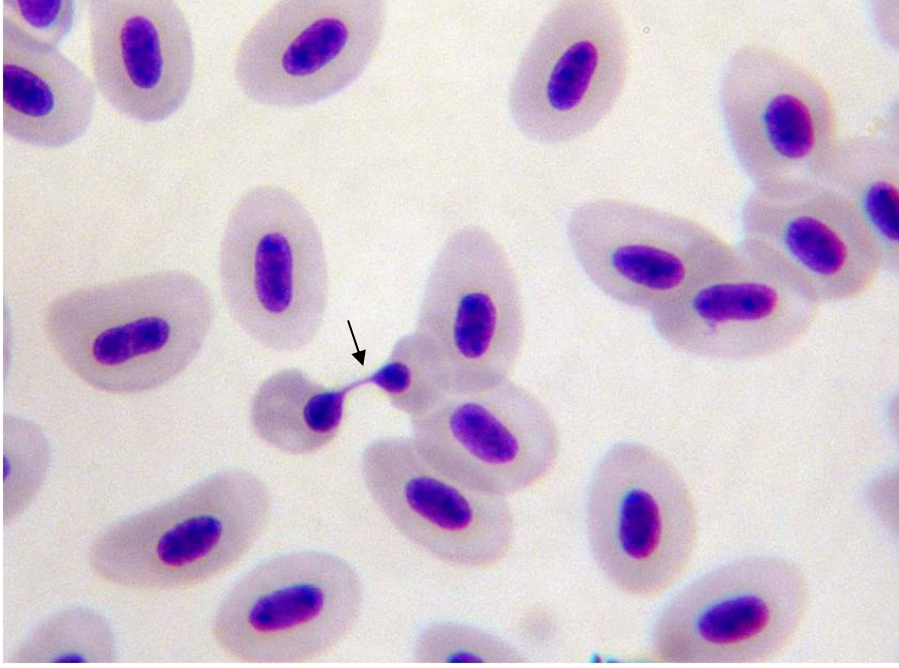
Şekil 4.8. B.Balıkli istasyonundan alınan örneklerde çentikli (notched) nukleuslu eritrosit



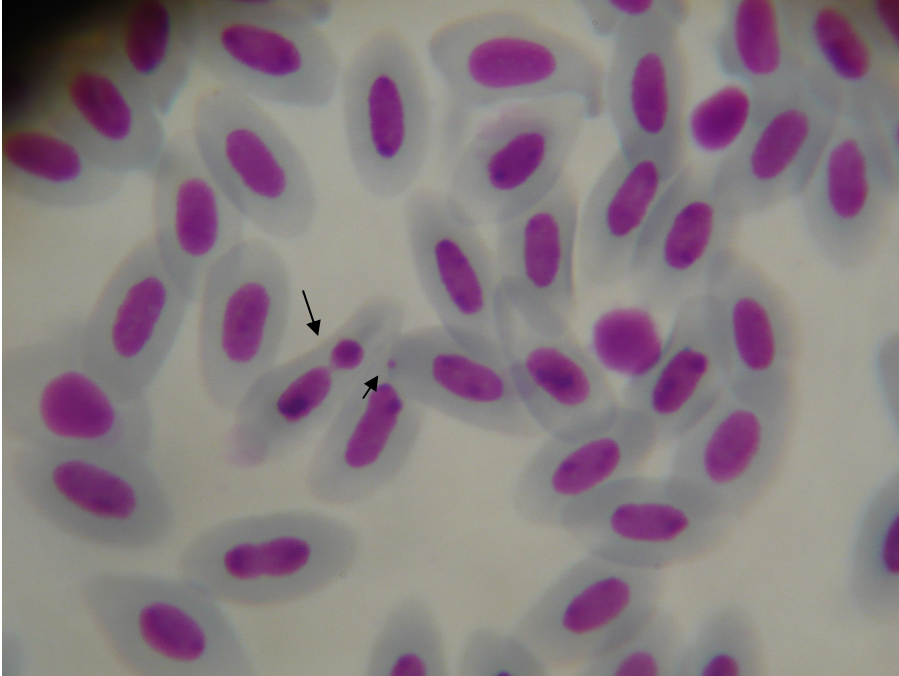
Şekil 4.9. B.Balıkli istasyonundan alınan örneklerde tomurcuklu (blebbed) nukleus içeren eritrosit



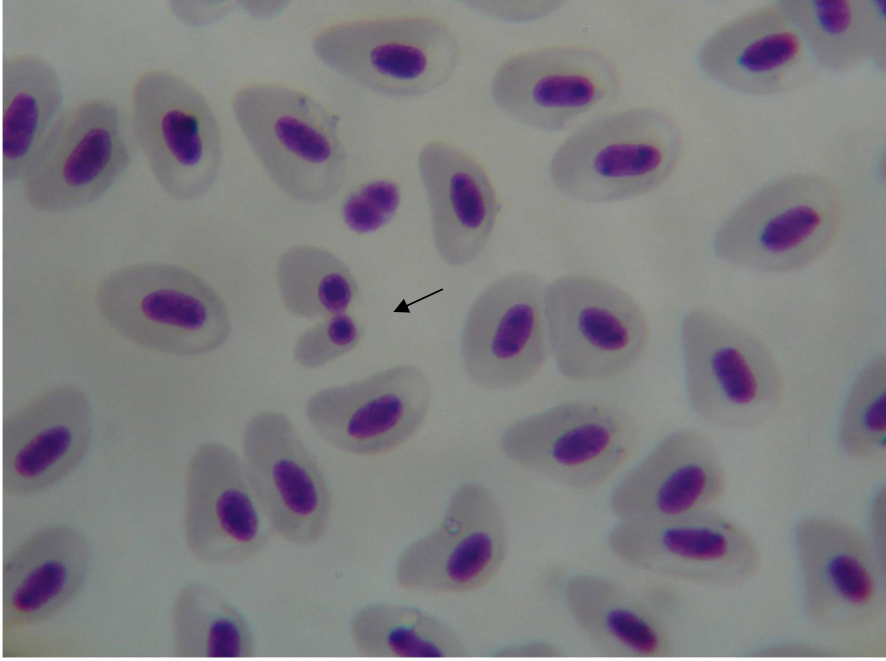
Şekil 4.10. Buttım istasyonundan alınan örneklerde loşlu nukleus içeren eritrosit



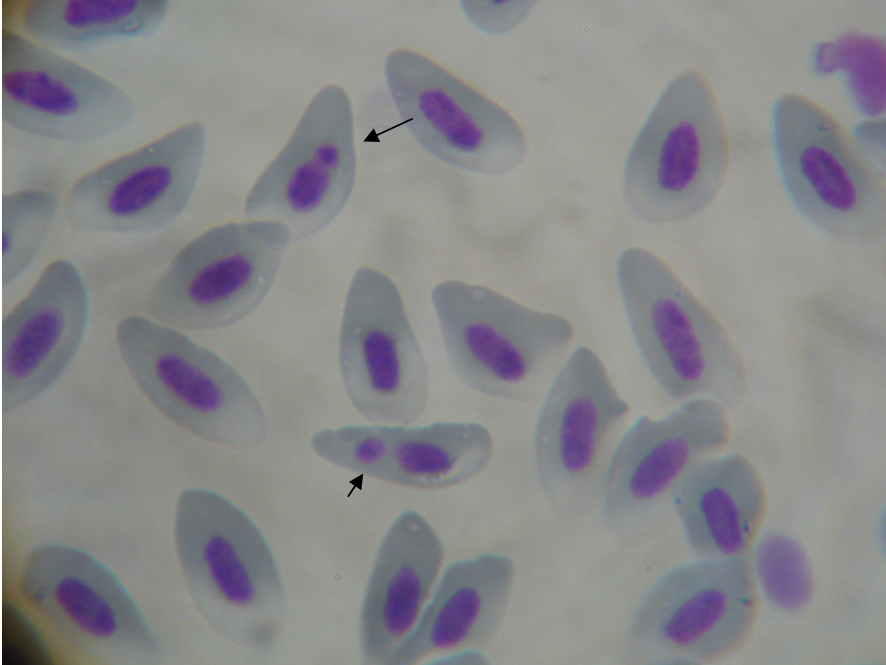
Şekil 4.11. Çekrice istasyonundan alınan örneklerde nükleoplazmik köprü (binükleate) çift çekirdekli eritrosit



Şekil 4.12. Buttım istasyonundan alınan örneklerde nükleoplazmik köprü (binükleate) çift çekirdekli (büyük ok) ve mikronukleuslu (küçük ok) eritrositler



Şekil 4.13. B.Balıkli istasyonundan alınan örneklerde çift çekirdekli (binukleate) eritrosit



Şekil 4.14. Çekrice istasyonundan alınan örneklerde çift çekirdekli eritrosit (küçük ok) ve tomurcuklu nukleus (büyük ok) içeren eritrosit

5. TARTIŞMA

Birçok ülkede toksik kimyasalların su kaynaklarına boşaltılması konusunda kanunlarla sınırlamalar getirilmeye başlanmakla beraber; endüstriyel bölgelerdeki atıklar ile evsel atıklar sucul çevredeki yüksek oranda toksik madde varlığının kaynaklarıdır (Çavaş ve Ergene-Gözükar 2005). Bu kimyasallara maruz kalan sucul organizmalardaki potansiyel genotoksik etkiler henüz tam olarak anlaşılammıştır. Sucul çevrede bulunan birçok kirletici, yalnızca organizmaların fizyolojisini ve yaşamını etkilemez aynı zamanda mutasyonlara ve kansere sebep olan genetik değişiklikler oluşturur (Russo ve ark. 2004). Gelecek kuşaklar ise germ hücrelerinde oluşabilecek mutasyonlar yoluyla meydana gelen genetik hastalıklar, azalmış uyum ve embriyonik yaşayabilirlik bakımından etkilenebilirler (Kurelec 1993). Bu sebeplerle sucul sistemlerdeki çevreyle ilgili çalışmalarda genotoksisite değerlendirmeleri oldukça önemlidir. *In vitro* laboratuvar çalışmaları gerçek hayattaki maruziyeti yansıtmada zayıf kaldıkları için hedef organizmaların *in vivo* ve *in situ* değerlendirilmesi sucul çevrelerdeki kirletici karışımlarının potansiyel genotoksisitesi üzerine daha gerçekçi bir yaklaşım sağlar (Depledge 1996).

Çalışmada Nilüfer çayının ovadaki üç farklı bölgesinden alınan su örneklerinin fizikokimyasal analizlerinde Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb ve Zn oranlarının oldukça yüksek olduğu belirlendi. Bu örnekleme bölgelerinden Buttım istasyonuna birçok dere vasıtasıyla Bursa'nın çeşitli Bölgelerinden evsel, endüstriyel ve tarımsal faaliyetlerden kaynaklanan atıklar ulaşmaktadır. Bunlardan Cilimboz özellikle Cilimboz bölgesindeki deri tabaklama işyerlerinin atıklarını taşımaktadır. Ayrıca Buttım bölgesinde otomotiv yan sanayi ve tekstil fabrikaları yoğun olarak yerleşmiştir. Genel olarak, anılan işyerlerinden, tekstil fabrikalarında pigment ve boya üretiminden kaynaklanan atıksu örneklerinde Cu, Cr, Ni ve Cd'un yüksek oranda bulunduğu daha önceki çalışmalarda belirlenmiştir. Deri tabaklama atölyelerinden de benzer ağır metallerin atık sularla Nilüfer çayına aktarıldığı bilinmektedir (Güleryüz ve ark. 2008). Bursa ovasında bulunan üç önemli sanayi bölgesinin (Bursa Organize, Nilüfer Organize ve Demirtaş Organize Sanayi Bölgeleri) ve diğer küçük sanayi bölgelerinin (Hasanağa Organize

Sanayi) atıkları yeterli arıtıma tabi tutulmadan Nilüfer çayının yan kolları aracılığıyla ya da özellikle bizim örnekleme bölgelerimiz olan Buttım, Çekrice ve B.Balıkli noktalarından doğrudan çaya aktarılmaktadır (Güleryüz ve ark. 2008). Nilüfer çayı aynı zamanda Bursa ovasında tarımsal faaliyetlerde sulama amaçlı da kullanılmaktadır. Bu sebeple çayın sularıyla yetişen bitkiler de çaydaki ağır metal ve organik kirlilikten etkilenebilir. Bu bitkiler besin zinciri yoluyla insanlara ulaşır ve içeriğindeki ağır metaller insanların etkilenmesine sebep olabilirler. Bu konuda yapılmış bir çalışmada Nilüfer çayının suladığı topraklarda doğal olarak yetişen ve bizim örnekleme yaptığımız istasyonların yakınlarından alınan dört farklı tür bitkinin (*Polygonum*, *Rumex*, *Urtica* ve *Xanthium*) ağır metal içerikleri belirlenmiştir. Özellikle Cilimboz ve Buttım Bölgelerinden toplanan bitkilerde Cr, Cu, Mn, Ni ve Zn oranlarının temiz bölgeden toplananlarla karşılaştırıldığında anlamlı ve yüksek olduğu bulunmuştur (Güleryüz ve ark. 2008).

Yüksek oranda ağır metallere maruziyet, kromozomal yapı kusurları, DNA-DNA çapraz bağları, DNA-protein çapraz bağları, serbest radikal oluşumu, oksidatif DNA baz hasarları, mikronukleus gibi bir çok genotoksik sonuçlar doğurmaktadır (Bogdanowa ve ark., 2002, Arrouijal ve ark., 1990; Kasprzak, 1991). Bizim çalışmamızdaki ortaya çıkan yüksek oranda mikronukleus ve çekirdek anomalileri kirli istasyonlardan alınan su örneklerinde gözlenen ağır metal konsantrasyonunun ve organik kirleticiler etkisiyle meydana gelmiş olabilir.

Bu çalışmada çoklu varyans analizi ile tüm istasyonların tüm konsantrasyonları ve farklı muamele zamanları mikronukleus frekansı açısından karşılaştırıldığında önemli bir farklılık bulunmadı. Çalışmada kirli bölgelerden alınan su örneklerinde balıklar yaşamadığından yaşayabildikleri konsantrasyona kadar örnekler seyreltilmek zorunda kaldı. Bu sebeple ancak %20 ve %10' luk konsantrasyon düzeyleri balıklara uygulanabildi. Bu sebeple konsantrasyon ve muamele zamanı bakımından önemlilik bulunmaması balıkların ancak seyreltilmiş örneklere maruz kalmasından kaynaklanabilir. Ancak istasyonlar arasında mikronukleus oranları bakımından önemli farklılık bulundu ve bu sonuçlar istasyonlardaki ağır metal ve organik kirlilik düzeylerinin temiz bölge olan Baraklı'ya oranla farklı ve yüksek olmasından

kaynaklanabilir. İstasyonları kendi aralarında mikronukleus oranı açısından karşılaştırdığımızda ise temiz bölge Baraklı ile karşılaştırıldığında Buttım ve B.Balıkli su örneklerine maruz bırakılan balıkların eritrositlerinde önemli oranda mikronukleus artışı gözlemlendi. Bu istasyonlarda Al, Cd ve amonyak (NH₃-N) oranlarının Buttım'de Çekrice'ye göre nispeten daha yüksek olduğu görülmektedir (Çizelge 3.1). Ancak yine Al, Cr, Ni, Pb ve NH₃-N oranlarının Çekrice'ye yakın veya daha yüksek olduğu Çizelge 3.1.'den anlaşılmaktadır. Bu sonuçlara göre istasyonlar arası mikronukleus frekansındaki önemli farklılık anılan ağır metal düzeylerindeki yükseklik ve diğer organik bileşiklerden kaynaklanabilir. Haritada belirtilmemekle birlikte Çekrice bölgesi yakınındaki Bursa Organize ve Nilüfer Organize Sanayi Bölgelerinin arasında BUSKİ Batı Atıksu Arıtma Tesisi bulunmaktadır. Bu tesisin varlığı o bölgedeki iki büyük sanayi bölgesinin atıklarının temizlenmesi için yeterli olamamakla birlikte, Çekrice örneklerindeki düşük mikronukleus oranını açıklayabilir.

Son yıllarda yapılan birçok çalışma, oluşum mekanizmaları tam olarak anlaşılmasa da genotoksik ajanlara maruz kalma ile artan çekirdek anomalileri arasında bir ilişki bulunduğunu göstermektedir (Bolognesi ve ark. 2006). Çavaş ve Ergene-Gözükara 2003, Çavaş ve Ergene-Gözükara 2005a,b, Matsumoto ve ark. 2006). Özellikle loplü ve tomurcuklu çekirdek oluşumu ile ilgili artan oranda çalışmaya rastlanmaktadır. Disentrik kromozomların ayrılmasındaki problemler veya gen amplifikasyonu bu fazla DNA'nın çekirdekten uzaklaştırılması sırasında Kırılma-Köprü-Birleşme siklusuna sebep olarak loplü veya tomurcuklu çekirdek oluşumunu tetikleyebilir (Tolbert ve ark. 1992, Shimizu ve ark. 1998). Bu çalışmada çentikli çekirdekli eritrosit, tomurcuklu çekirdekli eritrosit, nükleoplazmik köprülü çift çekirdekli ve çift çekirdekli eritrosit oranlarındaki artış bakımından istasyonlar arasında önemli bir farklılık bulundu. Daha önce gerçekleştirilmiş balık mikronukleus ve çekirdek anomalisi çalışmalarında çekirdek anomalisi kriterleri olarak çentikli, loplü, tomurcuklu ve çift çekirdekli eritrositler kullanılmıştır (Al-Sabti ve Metcalfe 1995, Ayllon-Garcia Vasquez 2000, Çavaş ve ark.2005, Çavaş ve Ergene-Gözükara 2005a,b).

Bu çalışmada gözlenen çekirdek anomalileri arasında daha önce kullanılmayan nükleoplazmik köprülü çift çekirdekli eritrositlere sıklıkla rastlandığından fotoğraflanıp

istatistiksel önemlilik bakımından da karşılaştırıldı. Gözlenen nükleoplazmik köprülerin olasılıkla disentrik kromozomların oluşturduğu köprüler olduğu düşünülmektedir. Çalışmada istasyonlar arasında önemli farklılık gösteren çekirdek anomalilerinin özellikle temiz bölge olan Baraklı istasyonundan elde edilen sonuçlara göre doza ve muamele zamanına bağlı olmaksızın önemli oranda arttığı görülmektedir. Çekrice, Buttım ve B.Balıkli istasyonlarından alınan örnekler maruz bırakılan balıklarda çekirdek anomali oranındaki artışın bu bölgelerde belirlenen yüksek orandaki ağır metal ve organik madde kirliliğinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Çalışmada gözlenen mikronukleus sonuçları daha önce sucul ortamlarda gerçekleştirilmiş balık mikronukleus çalışmalarının sonuçlarıyla uyumlu görünmektedir. Deniz sularında yaşayan balıklarla yapılmış bir çalışmada *Mugil cephalus* eritrositlerinde üç farklı kirli örnekleme bölgesinde hem mikronukleus hem çekirdek anomali oranının temiz referans bölgedekilere oranla önemli artış gösterdiği belirlenmiştir (Çavaş ve Ergene-Gözükar 2005). Akdeniz bölgesindeki Göksu deltasında yapılan benzer bir çalışmada da üç farklı balık türünde mikronukleus ve çekirdek anomalisi oranlarının bölgedeki ağır metal kirliliğine bağlı olarak önemli artış gösterdiği bulunmuştur (Ergene ve ark. 2007a). Akdeniz bölgesinde Berdan nehri suları ile israil sazani kullanılarak yapılan çalışmada özellikle nehrin kirli bölgelerinden alınan sulara maruz kalan balıklarda mikronukleus ve çekirdek anomalisi oranlarının istatistiksel önemli oranda arttığı ve bu artışın sudaki ağır metal kirliliğine bağlı olduğu öne sürülmüştür (Ergene ve ark. 2007b). Nehir sularıyla yapılan bir başka çalışmada özellikle Cr içeren bölgelerdeki su örneklerine maruz kalmış israil sazani eritrositlerinde yüksek oranda mikronukleus ve çekirdek anomalisine rastlanmıştır (Matsumoto ve ark. 2006). Çalışmamızdaki istasyonlar arası mikronukleus ve çekirdek anomalisi sıklıklarındaki önemli farklılığın su örneklerinin alındığı bölgelerdeki endüstriyel ve evsel atıklardan kaynaklanan ağır metal ve diğer kirlleticilere bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Sonuç olarak Bursa ovasının önemli bir su kaynağı olan Nilüfer çayı, çalışmamızdaki bulguların gösterdiği gibi genotoksik kirleticilerle –ağır metal ve organik maddeler- kontamine olmakta ve bu kirleticiler büyük oranda ovada yerleşmiş

sanayi bölgeleri ve evlerden gelen atıkların arıtılmadan çaya aktarılmasından kaynaklanmaktadır. Nilüfer çayına bırakılan endüstriyel ve evsel atıkların arıtma sürecinden geçirilmeden atılımının önlenmesinin çaydaki kimyasal kirlilik oranını aşağı düzeylere çekebileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

AKİF, M., A. R. KHAN, K. SOK, K.S. MIN, Z. HUSSIAN Z., M. MAAL-ABBAR. 2002. Textile effluents and their contribution towards aquatic pollutions in the Kabul River (Pakistan). J. Chem. Soc. Pak., 24: 106-111.

ALI, K. ve M.A. JAVID. 1996. Pollution and industrial waste Labore:6th National Congress Soil Science ., pp 122-131.

ALLOWAY, B.J. 1995. Heavy metal in soils, 2nd ed. London : Blackie Academic & Professional. 368 pp.

AL-SABTI, K. ve C.D. METCALFE. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. Mutat Res., 43:121–135.

AONGHUSA, N.C., N.F. GRAY. 2002. Laundry detergents as source of heavy metals in Irish domestic wastewater. J. Environ. Sci. Health., 37:1-6.

ARKHIPHUCK, V.V. ve N.N. GARANKO. 2005. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. Ecotoxicol. Environ. Saf., 62:42-52.

ARROUIJAL, F.Z., HILDEBRAND, H. VOPHI, D. MARZIN. 1990. Genotoxic activity of nickel subsulphide a-Ni₃S₂. Mutagenesis, 5:583–589.

AYLLON, F. ve E. GARCIA –VASQUEZ. 2000. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and *mollie Poecilia latipinna* :an assessment of the fish micronucleus test. Mutat Res., 467:177-186.

BOGDANOVA, A.Y., M. GASSMANN, M. NIKINMAA. 2002. Copper ion redox state is critical for its effects on ion transport pathways and methaemoglobin formation in trout erythrocytes. Chem. Biol. Interact., 139:43–59.

BOLOGNESI, C., R. RABBONI, P. ROGGIERI. 1996. Genotoxicity biomarkers in *M. Galloprovincialis* as indicators of marine pollutants. Comp.Biochem.Physol., 113C:319-323.

BOLOGNESI, C., E. PERRONE, P. ROGGIERI, D.M. PAMPANIN, A. SCIUTTO. 2006. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. Aquatic Toxicology, 78S :S93-S98

CAFETTI, J.D., M.S. MANTOVANI, M.C. PASTORI, A.S. FENOCCHIO. 2008. First genotoxicity study of Parana river from Argentina using cells from the clam *Corbicula fluminea* (Veneroida Corbiculidae) and Chinese hamster (*Cricetulus grius* Rodentia, Cricetidae) K1 cells in the comet assay. Gen. And Mol. Bio., 31,2:561-565.

CARRASCO, K., K.L. TILBURY, M.S. MYERS. 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 47:2123–2136.

CHEN, G. ve P.A. WHITE. 2004. The mutagenic hazards of aquatic sediments. A review. Mutat Res 567:151-225.

CLAXTON, L.D., V.S. HOUK, T.J. HUGLES. 1998. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. Mutat. Res., 410:237-243.

ÇAVAS, T. ve S. ERGENE-GÖZÜKARA. 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. Mutat. Res., 538:81–91.

ÇAVAŞ, T. ve S. ERGENE-GÖZÜKARA . 2005a. Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining. *Environ. Toxicol. And Phar.*, 19:107-111.

ÇAVAŞ, T. ve S. ERGENE-GÖZÜKARA. 2005b. Micronucleus test in fish cells: A bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environ. And Mol. Mut.*, 46:64-70

ÇAVAŞ, T., N.N. GARANKO, V.V. ARKHIPCHUK. 2005. Induction of micronuclei and binuclei in blood,gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food and Chem.Toxicol.*,43:569-574.

ÇAVAŞ, T. ve S. KÖNEN. 2008. *In vivo* genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. *Aquatic Toxicology.*, 90 :154–159.

DE CONTO CİNİER, C., M. PETİT-RAMEL M., R. FAURE, M. BORTOLATO. 1998. Cadmium accumulation and metallothionein biosynthesis in *Cyprinus carpio* tissues. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 61:793-799.

DE FLORA, S., L. VİGANO, F. D'AGOSTİNİ, A. CAMOİRANO, M. BAGNASCO,C. BENNICELLİ ve ark.1993.Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. *Mutat. Res.*, 319: 167-77.

DEGUCHI, Y., T. TOYOIZIMI, S. MASUDA, A. YASUHARA , S. MOHRI, M. YAMADA,Y. INOUE Y., N. KINAE. 2007.Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. *Mutat. Res.*, 627:178-185

DEPELEDGE, M.H. 1996. Genetic ecotoxicology: an overview.*J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 200: 57-66.

DERE, S., D. KARACAOĞLU, N.DALKIRAN. 2002. A Study on the Epiphytic Algae of the Nilüfer Stream (Bursa). *Turk.J.Bot.*, 26,219-234.

ELLINGHAM, T.J., A.E. CHRISTENSEN, M.B. MADDOCK. 1986. In vitro induction of sister chromatid exchanges and Chromosomal Abberations in peripheral lymphocytes of oyster toadfish and American eel. *Environ.Mut.*, 8:555-569.

ERGENE, S., T. ÇAVAŞ, A. ÇELİK, N. KÖLELİ, F. KAYA, A. KARAHAN. 2007a. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erthrocytes of three fish species from Göksu delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology.*, 16:385-391.

ERGENE, S. , T. ÇAVAŞ, A. ÇELİK, N. KÖLELİ ve C. AYMAK. 2007b. Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test *Environmental and Mol.Mut.*, 48:000-000 (4).

FERREIRA, A.L.G., S. LOUREIRO, A.M.V.M. SOARES. 2008. Toxicity prediction of binary combinations of cadmium,carbendazim and low dissolved oxygen on *Daphnia Manga*. *Aquatic Toxicology*, 89:28-39.

FRESHNEY, I. 2001.Aplication of cell culturesto toxicology. *Cell Biology and Toxicology.*, 17:213-230.

GONJITO, A.M.d.M.C., R.E. BARRETO, G. SPEIT, V.A.V. REYES, G.L. VOLPATO, D.M.F. SALVADORI. 2003. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Gen. Tox. and Environ. Mut. Mutat. Res.*, 534:165-172.

GÜLERYÜZ, G., H. ARSLAN, C. ÇELİK, Ş. GÜÇER, M. KENDALL. 2008. Heavy metal content of plant species along Nilüfer Stream industrialized Bursa city, Turkey. *Water Air Soil Pollut.*, 195:275-284.

- HAYASHI, M., T. UEDA, K. UYENO, K. WADA, N. KINAE, K. SAOTOME, N. TANAKA, A. TAKAI, Y.F. SASAKI, N. ASANO, T. SOFUNI, Y. OJIMA. 1998. Development of genotoxicity assay system that use aquatic organisms. *Mutat. Res.*, 399:125-133.
- HEDDLE, J.A., M.C. CIMINO, M. HAYASHI, F. ROMAGNA, M.D. SHELBY, J.D. TUCKER, P. VANPARYS, J.T. MACGREGOR. 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present and future. *Environ. Mol. Mutagen.*, 18:277-291.
- IPCS. 1985. Guide to Short-term Tests for Detecting Mutagenic and Carcinogenic Chemicals. World Health Organization. Geneva.
- KARAER, F. 1996. Environmental pollution and carcinogenic risk. *Jour. of Environ. Path. Tox. And Onc.*, 15/(2-4) :105-113.
- KASPRZAK, K.S. 1991. The role of oxidative damage in metal carcinogenicity. *Chem. Res. Toxicol.*, 4:604-615.
- KURELEC, B. 1993. The genotoxic disease syndrome. *Mar. Environ. Res.*, 35: 341-348.
- LLORENTE, M.T., A. MARTOS, A. CASTANO. 2001. Detection of cytogenetic alterations and blood cell changes in natural populations of carp. *Ecotoxicology*, 11:27-24.
- MADDOCK, M.B., H. NORTHROP, T.J. ELLINGHAM. 1986. Induction of sister-chromatid exchanges and Chromosomal aberrations in hematopoietic tissue of a marine fish following in vivo exposure to genotoxic carcinogens. *Mutat Res.*, 172:165-175.
- MANA, G.K., SADUKHAN A. 1986. Use of cells of gill and kidney of Tilapia fish in micronucleus test (MNT). *Curr. Sci.*, 55:498-501.
- MATSUMOTO, S.T., M.S. MANTOVANI, M.I.A. MALAGUTTI, A.L. DIAS, I.C. FONSECA, M.A. MARIN-MORALES. 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root tips. *Genet. Mol. Biol.*, Vol. 29 no:1 (1).
- McGEER, J.C., C. SZEVEDINSZKY, D.G. McDONALD, C.M. WOOD. 2000. Effects of chronic sublethal exposure to water-borne Cu, Cd or Zn in rainbow trout: tissue specific metal accumulation. *Aquat. Toxicol.*, 50:245-256.
- OBERHOLSTER, P.J., A.-M. BOTHA, T.E. CLOETE. 2007. Biological and chemical evaluation of sewage water pollution in the Rietvlei nature reserve wetland area, South Africa. *Environ Pollut.*, 156:184-192.
- OJIMA, Y., K. UENO, M. HAYASHI. A review of the chromosome numbers in fishes. *La Kromosomo II-I*. 1976. 19-47.
- PANTALEAO, S.de M., A.V. ALCANTARA, J. De P.H. ALVES, M.A. SPANO. 2006. The piscine micronucleus test to assess the impact of pollution on the Japarutaba river in Brazil. *Environ. And Mol. Mut.*, 47:219-224.
- PERRY, D.M., J.S. WEIS, P. WEIS. 1988. Cytogenetic effects of methylmercury in embryos of the killifish *Fundulus heteroclitus*. *Teratology*, 16:317-326.
- RAMADA, F. 1987. *Ecotoxicology*. Great Britain: John Wiley and Sons :22-181.
- RUSSO, C., L. ROCCO, M.A. MORESCALCHI, V. STINGO. 2004. Assessment of environmental stress by micronucleus test and comet assay on genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 57(2): 168-174.
- SCHMID, W. 1975. The micronucleus test. *Mutat. Res.*, 31:9-15.

SHIMUZU, N., N. ITOH, H. UTIYAMA, G.M. VAHL. 1998. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S-phase. *J. Cell Biol.*, 140:1307-1320.

SMET, H.D., B.D. WACHTER, R. LOBINSKI. 2001. Dynamics of (Cd, Zn)-metallothioneins in gills, liver and kidney of common carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. *Aquat. Toxicol.*, 52:269-281.

TALAPATRA, S.N., S.K BANERJEE. 2007. Detection of micronucleus and abnormal nucleus in erythrocytes from the gill and kidney of *Labeo bata* cultivated in sewage-fed fish farms. *Food and Chem. Tox.*, 45:210-215.

TOLBERT, P.E., A.C. SHY, J.W. ALLEN. 1992. Micronuclei and other nuclear abnormalities in buccal smears: methods development. *Mutat. Res.* 271: 69-77.

TUNCEL, S.G., S.Y. KARAKAŞ, U. ÖZER. 1996. Atmospheric pollutants in Uludağ National Park. *Jour. of Environ. Path. Tox. And Onc.*, 15/(2-4) :115-127.

VALKO, M., H. MORRIS, M.T. CRONIN. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.*, 12:1161-208.

WATANABE, T., T. HIRAYAMA. 2001. Genotoxicity of soil. *Jour. of Health Sci.*, 47(5): 433-438.

WHITE, P.A ve J.B. RASMUSSEN. 1998. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutat. Res.*, 410:223-236.

ZHU, Y., J. WANG, R. ZHANG. 2004. Cadmium, Chromium and Copper induce polychromatocyte micronuclei in carp (*Cyprinus carpio L.*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 72:78-86.

TEŐEKKÜR

Bana bu konuda çalışma olanağı veren ve tezimin her aŐamasında yardımına baŐvurduđum danıŐmanım Doç. Dr. Nilüfer İNKİLİ' a, deney ve yazım esnasında tezle ilgili birçok konuda baŐvurduđum Bölüm BaŐkanımız Prof. Dr. Rahmi BİLALOĞLU' na, balıklarla ilgili her türlü konuda yardımlarına baŐvurduđum Doç. Dr. Hikmet Sami YILDIRIMHAN ve Doç. Dr. İsmail H. UĐURTAŐ hocalarıma, Genel Biyoloji'de Doktora ve Yüksek Lisans yapan ve deneylerimde emeği geçen tüm arkadaşlarıma, tezimin her aŐamasında benimle beraber çalıŐan ve destek olan annem Lütfiye SUMMAK' a, beni destekleyen aileme ve Gianluca MELE'ye; istatistik değerlendirmedeki yardımlarından ötürü Yrd. Doç. Dr. Serap ÇELİKLER'e, tezimde kullandığım resimlerin düzenlenmesinde emeği geçen ve deneyimlerini paylaŐan Doç. Dr. Tolga ÇAVAŞ'a, çalışmada kullanılan su örneklerinin analizi gerçekleŐtiren BUSKİ Doğu Atıksu Arıtma Tesisi Laboratuvarı' ndan Erdiñ INGAY, evre Mühendisi Sinem ZENGİNAY, Kimya Teknisyeni Nihat MERİÇ ve Laboratuvar Elemanı Yalçın BALTACI' ya, çalışmada kullanılan balıkları temin etmemde yardımcı olan Gölyazı Köyü sakinlerine teŐekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

ŞENAY SUMMAK 1983 yılında Bursa' da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Bursa ilinde tamamladı. 2005 yılında İstanbul Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Biyolog ünvanı ile mezun oldu. 2006 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.